

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DOS ALIMENTOS

Sandra Kunde Schlesner

**DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS EM REFRIGERANTES  
COM *SMARTPHONE***

Santa Maria, RS  
2020

**Sandra Kunde Schlesner**

**DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS EM REFRIGERANTES COM  
*SMARTPHONE***

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.**

Orientador: Prof. Dr. Juliano Smanioto Barin

Santa Maria, RS  
2020

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Schlesner, Sandra kunde  
Determinação de Açúcares Totais em Refrigerantes com  
Smartphone / Sandra kunde Schlesner.- 2020.  
87 p.; 30 cm

Orientador: Juliano Smanioto Barin  
Coorientador: Roger Wagner  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós  
Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2020

1. Smartphone; 2. Imagens digitais; 3. Aparelho  
portátil; 4. Açúcar redutor; 5. Colorimetria. I. Barin,  
Juliano Smanioto II. Wagner, Roger III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, SANDRA KUNDE SCHLESNER, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

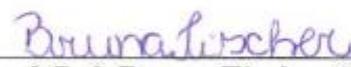
Sandra Kunde Schlesner

**DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS EM REFRIGERANTES COM  
SMARTPHONE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

Aprovado em 09 de março de 2020:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Juliano Smanioto Barin (UFSM)  
(Presidente/Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Bruna Tischer (UFRGS)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Rodrigo Cordeiro Bolzan (UFSM)

## **AGRADECIMENTOS**

A Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos (PPGCTA) e ao Núcleo de Tecnologia dos Alimentos (NTA), pela possibilidade de execução desse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo incentivo a pesquisa.

Ao Prof. Dr. Juliano Smanioto Barin, pela orientação neste trabalho, pela disponibilidade, pela confiança, pelo exemplo de profissionalismo, pelas oportunidades de crescimento profissional e pessoal, pelo convívio e pela amizade.

Aos Prof. Drs. Rodrigo Cordeiro Bolzan e Bruna Tischer, pela participação na banca examinadora, e pelas contribuições feitas para o aprimoramento deste trabalho.

Aos colegas do NTA pelo convívio, amizade e colaboração. Em especial aos meus colegas de grupo, que contribuíram e participaram diretamente deste trabalho, me ajudando em todos os momentos.

Ao Alexandre e aos meus filhos Yuri e Ricardo, que estiveram sempre ao meu lado, pelo apoio, paciência e carinho, além da compreensão e incentivo nos momentos difíceis durante esta trajetória.

Agradeço a minha família e amigos, por estarem comigo em todos os desafios da vida.

## RESUMO

### DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS EM REFRIGERANTES COM *SMARTPHONE*

AUTORA: Sandra Kunde Schlesner  
ORIENTADOR: Juliano Smanioto Barin

As técnicas geralmente utilizadas para a determinação de açúcar em bebidas não alcoólicas empregam métodos clássicos baseados em diferentes princípios físicos e químicos. Uma característica comum destes métodos é o longo tempo de análise, o consumo de elevada quantidade de reagentes e geração de resíduos. Em alguns casos, como no método oficial para determinação de açúcares em bebidas, o procedimento analítico deve ser efetuado sob altas temperaturas, o que oferece riscos ao analista. O uso de imagens digitais vem crescendo como uma alternativa aos métodos analíticos clássicos, onde a cor gerada durante uma reação é associada à variação na concentração de uma substância de interesse. Análises que antes eram restritas a equipamentos de uso laboratorial, como espectrofotômetros, podem ser feitas de maneira rápida, com menor custo e geração de resíduos, permitindo até mesmo a análise em campo. Um método analítico colorimétrico, baseado no uso de imagens digitais foi proposto para a determinação do teor total de açúcar de refrigerantes, buscando rapidez, facilidade de uso, portabilidade e redução de consumo de energia, reagentes e geração de resíduos. As imagens foram capturadas com uma câmera endoscópica que pode ser acoplada a qualquer *smartphone*. A câmera é inserida em um dispositivo fabricado com impressora 3D e as fotos foram tiradas diretamente dos frascos usados para as reações colorimétricas. As imagens foram obtidas antes e após a etapa de centrifugação. Parâmetros experimentais como tempo de reação, volume total de solução e iluminação foram avaliados. Comparado com o método oficial (AOAC 923.09, titulação de Lane-Eynon), os métodos propostos apresentaram concordância de 95,3 a 108,7%. Dezenas de amostras puderam ser analisadas em uma hora. A utilização de um método de avaliação das características do método proposto (GAPI), relacionado à química verde, revelou uma redução do gasto energético em 5,5 vezes e um volume de resíduos 78 vezes menor quando comparados ao método da AOAC.

**Palavras-chave:** *Smartphone*, imagens digitais; aparelho portátil; açúcar redutor; colorimetria.

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF TOTAL SUGAR IN SOFT DRINKS, WITH SMARTPHONE

AUTHOR: Sandra Kunde Schlesner

ADVISOR: Juliano Smanioto Barin

The techniques commonly used for determination of sugar in non-alcoholic beverages are classical methods based on different physical and chemical principles. A common drawback of these methods is the long time for analysis, the consumption of a high amount of reagents and the generation of waste. In some cases, as for the official method for determination sugars in beverages (AOAC 923.09), the analytical procedure should be carried out under heating, which lead to safety risks to the analyst. Digital images have been used as an alternative to classic analytical methods, in which the color generated during a colorimetric reaction is associated with the variation in the concentration of analyte. Analyses that were previously restricted to equipment for laboratory use such as spectrophotometers, were carried out quickly, with lower cost and waste generation. Moreover, field analysis was feasible in such way. An analytical method based on the use of digital images has been proposed for the determination of the total sugar content of soft drinks. Rapidity, ease-to-use, portability, reduction of energy consumption and reagents and waste generation were considered. The images were captured with an external USB camera that can be coupled to any smartphone. The camera was inserted in a 3D-printed case and picture were taken directly from the flasks used for the colorimetric reactions. The images were obtained before and after the centrifugation step. Experimental parameters such as reaction time, total solution volume and lighting were evaluated. Compared with the official method (AOAC 923.09, Lane-Eynon titration), the proposed methods presented agreement from 95.3 to 108.7% with the official method. Hundreds of samples can be analyzed in one hour. The use of a chemical greenness index for evaluating the characteristics of the proposed method, was applied in this study, showing the reduction of energy expenditure by 5.5 times and 78 times less waste volume than the AOAC method.

**Keywords:** *smartphone*; digital images; portable device; reducing sugar; colorimetry.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Mecanismo da reação entre o monossacarídeo presente na amostra e o íon  $\text{Cu}^{2+}$ , que resulta na formação de precipitado de  $\text{Cu}_2\text{O}$ .....20
- Figura 2 - Redução do ácido 3,5- dinitrosalicílico pelo açúcar, em meio alcalino, a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico formando ácido aldônico. ....23
- Figura 3 - Representação gráfica do sistema RGB.....33

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Principais técnicas utilizadas para a determinação de açúcares em alimentos e bebidas. ....	17
Tabela 2 - Valores de rotação específica de alguns açúcares. ....	18
Tabela 3 - Métodos de determinação de açúcares em diversas matrizes, disponíveis na literatura .....	28
Tabela 4 - Trabalhos selecionados da literatura que utilizaram imagens digitais no visível. ..	34
Tabela 5 - Aplicações já efetuadas com o aplicativo Photometrix para determinações analíticas. .....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ADNS</b>	Ácido 3,5-dinitrosalicílico (do inglês, <i>3,5-Dinitrosalicylic acid</i> )
<b>ANR</b>	Açúcar não redutor
<b>AOAC</b>	<i>Association of Analytical Chemists</i>
<b>AR</b>	Açúcar redutor
<b>AT</b>	Açúcares totais
<b>ATR-IR</b>	Espectroscopia no infravermelho com reflectância total atenuada (do inglês, <i>Attenuated total reflectance infrared spectrometry</i> )
<b>CCD<sup>1</sup></b>	Cromatografia em camada delgada
<b>CCD<sup>2</sup></b>	Dispositivo de carga acoplada (do inglês, <i>Charge Coupled Device</i> )
<b>CG</b>	Cromatografia gasosa
<b>CLAE</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
<b>CLAE-AD</b>	Cromatografia de íons com detector amperiométrico (do inglês, <i>Ion Chromatography with Amperometric Detector</i> )
<b>CLAE-IR</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de índice de refração (do inglês <i>High performance liquid chromatography with refractive index detection</i> )
<b>CMOS</b>	Semicondutor de óxido metálico complementar (do inglês, <i>Complementary metal-oxide semiconductor</i> )
<b>CUPRAC</b>	Capacidade antioxidante redutora cúprica (do inglês, <i>Cupric reducing antioxidant capacity</i> )
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético (do inglês, <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
<b>FT-IR</b>	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (do inglês <i>Fourier-transform infrared spectrometry</i> )
<b>GC-MS</b>	Cromatografia gasosa com espectrometria de massa (do inglês, <i>Gas chromatography-mass spectrometry</i> )
<b>HCA</b>	Análise hierárquica de cluster (do inglês, <i>Hierarchical Cluster Analysis</i> )
<b>IAL</b>	Instituto Adolfo Lutz
<b>IC</b>	Cromatografia iônica (do inglês <i>Ion chromatography</i> )
<b>LDA</b>	Análise discriminante linear (do inglês, <i>Linear Discriminant Analysis</i> )
<b>MAPA</b>	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
<b>NIR</b>	Espectroscopia no infravermelho próximo (do inglês <i>Near-infrared spectrometry</i> )
<b>NIR-HSI</b>	Imagem hiperespectral no infravermelho próximo (do inglês, <i>near-infrared hyperspectral imaging</i> )
<b>PCA</b>	Análise de componentes principais (do inglês, <i>Principal Componentes Analysis</i> )
<b>PLS</b>	Mínimo Quadrados Parciais (do inglês <i>Partial Least Squares</i> )
<b>PLS-DA</b>	Análise parcial por quadrados discriminantes (do inglês, <i>Partial least Squares-Discriminant Analysis</i> )
<b>RF</b>	Refratometria
<b>RGB</b>	Vermelho, verde e azul (do inglês <i>Red, Green e Blue</i> )
<b>RMSEC</b>	Erro quadrático médio de calibração (do ingles, <i>Root Mean Square Error of Calibration</i> )
<b>RMSECV</b>	Erro quadrático médio de validação cruzada (do ingles, <i>Root Mean Square Error of Cross Validation</i> )
<b>RMSEP</b>	Erro quadrático médio de previsão (do ingles, <i>Root Mean Square Error of Prediction</i> )

**SIMCA** Modelagem independente suave de analogia de classe (do ingles, *Soft Independent Modeling of Class Analogy*)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>14</b>
3.1	AÇÚCARES EM ALIMENTOS E REFRIGERANTES .....	14
<b>3.1.1</b>	<b>Açúcares não-redutores (ANR)</b> .....	<b>15</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Açúcares redutores (AR)</b> .....	<b>15</b>
3.2	MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES EM ALIMENTOS E BEBIDAS .....	16
<b>3.2.1</b>	<b>Refratometria</b> .....	<b>17</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Polarimetria</b> .....	<b>18</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Enzimático</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Titulometria</b> .....	<b>19</b>
3.2.4.1	<i>Método de Lane-Eynon</i> .....	19
3.2.4.2	<i>Método Luff Schoorl</i> .....	21
3.2.4.3	<i>Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)</i> .....	21
<b>3.2.5</b>	<b>Reagente de Benedict</b> .....	<b>21</b>
<b>3.2.6</b>	<b>Gravimetria</b> .....	<b>22</b>
3.2.6.1	<i>Munson-Walker</i> .....	22
<b>3.2.7</b>	<b>Espectrofotometria</b> .....	<b>22</b>
3.2.7.1	<i>Ácido 3,5-dinitrossalicílico (ADNS)</i> .....	22
3.2.7.2	<i>Antrona</i> .....	23
3.2.7.3	<i>Método Fenol-sulfúrico</i> .....	24
3.2.7.4	<i>Somogyi-Nelson</i> .....	24
<b>3.2.8</b>	<b>Cromatografia</b> .....	<b>24</b>
3.2.8.1	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE</i> .....	25
3.2.8.2	<i>CLAE com detector de índice de refração (CLAE-IR)</i> .....	25
3.2.8.3	<i>CLAE com detector do tipo eletroquímico</i> .....	25
3.2.8.4	<i>Cromatografia de íons com detector amperométrico (CLAE-AD)</i> .....	26
3.2.8.5	<i>Cromatografia gasosa com espectrômetro de massas</i> .....	26
3.3	QUIMIOMETRIA .....	30
<b>3.3.1</b>	<b>Reconhecimento de padrões</b> .....	<b>31</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Calibração Multivariada</b> .....	<b>31</b>
3.4	IMAGENS DIGITAIS .....	32
<b>4</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>42</b>
4.1	MANUSCRITO .....	43
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>76</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>77</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Na indústria de alimentos e bebidas os padrões de qualidade devem ser atingidos a fim de se garantir propriedades desejadas, como doçura, higroscopicidade e viscosidade, nos produtos e a satisfação dos consumidores. Nesse sentido, há um interesse crescente por tecnologias inovadoras que permitam a avaliação rápida dos produtos com custos acessíveis. A determinação do teor de açúcares é um parâmetro de qualidade frequentemente avaliado nas mais diversas áreas, não somente em alimentos e bebidas. Por exemplo, em processos de fermentação, o acompanhamento da quantidade de açúcares permite verificar as taxas de consumo pelos microrganismos e, assim, estudar a cinética do processo. Na área da saúde, existem disfunções do organismo humano que são influenciadas pela concentração de açúcares no sangue, como a diabetes. No ramo da engenharia de tecidos, onde ocorre a produção de fibras artificiais, a glicose é o principal metabólito envolvido no crescimento celular. Desta forma, pode-se perceber que a determinação de açúcares indica a importância do desenvolvimento de novas estratégias analíticas dentro e fora de indústrias de alimentos e bebidas.

Na literatura, diversos trabalhos podem ser encontrados acerca do desenvolvimento de ferramentas rápidas e eficazes utilizadas para simplificar as análises de rotina necessárias para o controle da qualidade e caracterização de alimentos (BAŞKAN *et al.*, 2016; CAYUELA; WEILAND, 2010; OH *et al.*, 2017; RECH; WEILER; FERRÃO, 2018; SANTOS; SANTOS; AZEVEDO, 2014; VALENTE *et al.*, 2014; XIA *et al.*, 2015; ZHU *et al.*, 2019), tais como açúcares e ácidos orgânicos, sendo o último indicador de possíveis adulterações em produtos de origem vegetal.

As metodologias convencionais de determinação de açúcares não redutores como sacarose, e redutores como glicose e frutose, são embasados em métodos clássicos baseados em diferentes princípios físicos e químicos. Uma característica comum desses métodos é o longo tempo empregado na preparação dos vários reagentes utilizados e na execução da análise propriamente dita. Além disso, a quantidade de reagentes utilizado é elevada gerando uma grande quantidade de resíduos (ácidos, bases, elementos tóxicos) que devem ser tratados para futuro descarte (NEGRULESCU *et al.*, 2012). Em alguns casos, como nos métodos descritos em compêndios oficiais para a determinação de açúcares pelo método de Lane-Eynon (LANE; EYNON, 1923; LATIMER JR., 2019) o procedimento analítico (titulação) deve ser efetuado sob aquecimento, o que oferece riscos ao analista.

Assim, torna-se imprescindível o desenvolvimento de metodologias alternativas às aquelas comumente utilizadas em compêndios de análise de alimentos e bebidas, de forma a permitir a determinação de açúcares de forma rápida, simples, que não necessite de equipamentos caros e que garantam a segurança dos analistas.

Entre as possibilidades para desenvolvimento de métodos alternativos, destacam-se as imagens digitais, especialmente com o uso da colorimetria utilizando *smartphones*, que se baseiam na formação de compostos coloridos cuja intensidade de cor pode ser obtida pelo tratamento de imagens e relacionada com a concentração do analito (ASKIM; MAHMOUDI; SUSLICK, 2013; PUANGBANLANG *et al.*, 2019; SILVA NETO; FONSECA; BRAGA, 2016; SOARES; LIMA; ROCHA, 2017). Para tanto, já existem aplicativos disponíveis que permitem efetuar o processamento e o tratamento dos dados no próprio *smartphone*, o que torna o processo ainda mais simples, rápido, com baixo custo e com potencial para análises em campo. Nesse sentido, diversas aplicações podem ser encontradas para análise de alimentos e bebidas, como etanol em cachaça, acidez em leite *in natura*, íons fluoreto e fósforo em águas naturais e tratadas, ferro em suplementos vitamínicos, amônia total em água e flúor em sistemas alternativos de abastecimento de água (BAUMANN *et al.*, 2019; BEN DA COSTA *et al.*, 2019; BÖCK *et al.*, 2018; HELFER *et al.*, 2017, 2018). Contudo, não foram encontradas aplicações empregando *smartphone* para a determinação de açúcares em alimentos e bebidas.

Portanto, o objetivo deste trabalho consiste na avaliação do uso de imagens digitais obtidas por *smartphones* para a determinação de açúcar total em refrigerantes como forma de reduzir o tempo de análise de métodos convencionais que utilizam titulação ou espectrofotometria. Adicionalmente, propõe-se a diminuição da quantidade de reagentes utilizados na análise de forma a minimizar custos e a geração de resíduos, além de prover maior segurança ao analista. Neste contexto, pesquisas recentes têm comprovado que o uso de imagens digitais em *smartphones* é uma alternativa de baixo custo, rápida e que permite o controle de qualidade dos alimentos e processos industriais, com potencial inclusive para análise em campo, através do uso de um aparato simples, impresso em 3D.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo principal do presente trabalho foi avaliar o uso de *smartphone* para a determinação de açúcares totais em refrigerantes empregando-se imagens digitais e um aplicativo gratuito (*Photometrix UVC*).

## 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar os parâmetros que influenciam as medidas com *smartphone*
- Identificar as condições ótimas de análise
- Avaliar a exatidão frente a métodos de referência
- Avaliar as características do método proposto com relação à química verde

## 3 REVISÃO DA LITERATURA

### 3.1 AÇÚCARES EM ALIMENTOS E REFRIGERANTES

No Brasil, entre as bebidas não alcoólicas, o refrigerante tem grande destaque, sendo responsável por 73% da quantidade vendida em volume pela indústria de bebidas não alcoólicas do país, em 2015 (VIANA, 2018). Isso mostra a ampla difusão desta bebida e a necessidade de controle de qualidade do produto.

O refrigerante é uma bebida não alcoólica, formulada essencialmente por água potável, suco ou extrato vegetal, com o acréscimo de açúcares e/ou edulcorantes, sendo gaseificado através da adição de dióxido de carbono na própria indústria (BRASIL, 2009). Um dos principais ingredientes dos refrigerantes é o açúcar, o qual concede o gosto adocicado característico da bebida. Globalmente, a sacarose é o açúcar mais utilizado, em função de características como ser muito solúvel em água, incrementar os aromas das bebidas e ser estável na presença de muitas substâncias químicas. A sacarose é um dissacarídeo, que se encontra disponível na forma cristalina ou na forma líquida - xarope de sacarose (ASHURST, 2016). Os açúcares são utilizados em quantidades que variam de 7 a 12% (m/v), quando são a única fonte de doçura na formulação de um refrigerante (LIMA; AFONSO, 2009; SHACHMAN, 2004).

Os açúcares podem ser chamados de carboidratos, possuindo subclassificações de acordo com suas características químicas. Os carboidratos podem ser classificados de duas formas: os carboidratos simples, que são os monossacarídeos; os carboidratos complexos, que são compostos por dois ou mais monossacarídeos ligados entre si. O dissacarídeo sacarose é o açúcar mais utilizado para o preparo de doces, sorvetes, e adoçar refrigerantes não dietéticos. Sua fórmula molecular é  $C_{12}H_{22}O_{11}$ . Esse açúcar é resultado da união de uma molécula de frutose e outra de glicose. Ambas possuem a fórmula molecular  $C_6H_{12}O_6$ , mas na formação da

sacarose ocorre a liberação de uma molécula de água, formando a ligação glicosídica (BRUICE, 2005).

### **3.1.1 Açúcares não-redutores (ANR)**

Os dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos são conhecidos como não-redutores, pois não possuem, geralmente, aldeídos ou cetonas livres em soluções aquosas. Os açúcares não-redutores (ANR) precisam sofrer hidrólise da ligação glicosídica para serem oxidados. A sacarose, usada em refrigerantes, que é formada pela ligação entre o grupo funcional aldeídico de uma molécula de glicose e o grupo funcional cetônico de uma molécula de frutose, pode ser citada como um exemplo.

Os ANR são quantificados, geralmente, pelas mesmas metodologias que os açúcares redutores (AR) após a hidrólise, que pode ser química ou enzimática, para converter os ANR em AR obtendo-se glicose e frutose, dois monossacarídeos, como no caso da sacarose (DEMIATE *et al.*, 2002).

### **3.1.2 Açúcares redutores (AR)**

Existem açúcares que possuem os grupos carbonílicos livres e que reagem na presença de agentes oxidantes, normalmente em soluções alcalinas. Esses são os AR, que são geralmente monossacarídeos, como a glicose e a frutose. Contudo, alguns dissacarídeos, como a maltose (formada por duas moléculas de glicose) e a lactose (formada por glicose e galactose) também podem apresentar essa característica. Os métodos químicos usados para determinar carboidratos na forma de monossacarídeos são baseados no fato de que muitos desses apresentam poder redutor (em meio alcalino à quente) sobre os íons cúprico, prata e férrico, bem como de outras substâncias orgânicas, produzindo complexos coloridos, ou precipitados que podem ser quantificados (DEMIATE *et al.*, 2002; NELSON; COX, 2014; SARTINI *et al.*, 1998; TAVARES *et al.*, 2010).

A determinação de açúcares redutores é frequentemente realizada na indústria de vinho, sendo um parâmetro importante para acompanhamento do processo de fermentação e controle de qualidade (ARAÚJO *et al.*, 2000; LOPES *et al.*, 1995; SARTINI *et al.*, 1998). O monitoramento de açúcares totais (AT) é de grande importância na indústria sucro-alcooleira, principalmente no processo de melhoria da eficiência do processo de produção e qualidade da cana de açúcar em função do teor de sacarose e avaliação do estado de maturação da planta

(ZAGATTO *et al.*, 2005). A determinação de açúcares é também um parâmetro de fundamental importância para a avaliação de méis, pois permite a elaboração de padrões de qualidade e protege o consumidor de possíveis adulterações (ALVES *et al.*, 2005).

As técnicas analíticas para a determinação de teor de açúcar baseiam-se nas diferentes propriedades físicas ou químicas de cada açúcar para determinar sua concentração em uma amostra de interesse. Como comentado anteriormente, os ANR também podem ser determinados por meio dos métodos para AR, desde que eles sejam hidrolisados previamente de forma enzimática (ANDJELKOVIĆ; PIĆURIĆ; VUJČIĆ, 2010) ou química (AOAC, Método 923.09 A(c) (LATIMER JR., 2019)), para se tornarem redutores. Dessa forma, a seguir são discutidos os principais métodos empregados para determinação de açúcares em alimentos e bebidas.

### 3.2 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES EM ALIMENTOS E BEBIDAS

Diversos métodos analíticos têm sido propostos para a análise quantitativa de açúcares (p. ex. sacarose, glicose e frutose) em alimentos. Os métodos mais utilizados para determinação individual das moléculas de açúcar são os que envolvem métodos de separação como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia em camada delgada (CCD<sup>1</sup>) e a cromatografia gasosa (CG), pois são considerados seletivos, precisos e sensíveis (TAVARES *et al.*, 2010). Contudo estes não são métodos disponíveis para a maioria dos laboratórios presentes nas indústrias de alimentos, pois além do alto custo dos equipamentos, a operação é demorada e demanda analistas especializados.

Outros métodos convencionais mais acessíveis baseiam-se em princípios físicos ou químicos diferentes. Por exemplo, os AR reagem com íons cobre e outros agentes oxidantes e podem ser determinados através de técnicas analíticas que envolvam a titulometria de oxirredução (CALDAS *et al.*, 2015; OLIVEIRA, 2002). Dentre os métodos que podem ser usados para a detecção dos grupos aldeídos e cetonas dos AR estão os métodos com o uso de reagente de Tollens ( $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$ ), do reagente de Fehling ( $\text{Cu}^{2+}$ , complexado com o íon tartarato) e o reagente de Benedict ( $\text{Cu}^{2+}$ , complexado com o íon citrato) (CALDAS *et al.*, 2015).

Além desses métodos muitos outros têm sido propostos e baseiam-se em princípios muito diferentes entre si. Portanto a escolha para cada situação deve levar em conta a amostra a ser analisada, a viabilidade técnica, o tempo de resposta, o custo empregado e a confiabilidade necessária. Na Tabela 1 são listados os diversos métodos para determinação de açúcares.

Tabela 1- Principais técnicas utilizadas para a determinação de açúcares em alimentos e bebidas.

<b>Técnica</b>	<b>Método</b>	<b>Referência</b>
Refratometria	Índice de Refração - ° Brix	(CALDAS <i>et al.</i> , 2015)
Polarimetria	Rotação do plano de polarização	(LATIMER JR., 2019)
Enzimática	Enzima glicose oxidase	(BERGMAYER; BERNT, 1974)
Titulometria (Volumetria)	EDTA	(MATISSEK, R.; SCHENEPEL, F.M.; STEINER, 1998)
	Lane-Eynon	(LANE; EYNON, 1923)
	Luff-Schoorl	(MARRUBINI <i>et al.</i> , 2017)
Gravimetria	Musson-Walker	(SPENCER; MEADE, 1945)
Espectrofotometria	ADNS	(MILLER, 1959)
	Antrona	(LUDWIG; GOLDBERG, 1956)
	Fenol-sulfúrico	(DUBOIS <i>et al.</i> , 1956)
	Somogyi-Nelson	(MICHAEL, 1952; NELSON, 1944)
Cromatografia	CLAE	(MAGWAZA; OPARA, 2015)
	CG	(AL-MHANNA, 2018)
	CCD <sup>1</sup>	(FARAG, 1979)
	IC	(VENTE <i>et al.</i> , 2005)

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

ADNS - Ácido 3,5-dinitrosalicílico

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

CG – Cromatografia Gasosa

CCD<sup>1</sup> – Cromatografia em camada delgada

IC - Cromatografia iônica (do inglês *Ion chromatography*)

### 3.2.1 Refratometria

Esta é a técnica mais difundida e aplicada no controle industrial na determinação quantitativa de açúcares. É um método indireto, físico, não seletivo que determina a concentração de sólidos solúveis totais e por isso não faz nenhuma distinção entre os tipos de açúcares presentes e suas concentrações.

O refratômetro mede o desvio da luz e retorna um valor de índice de refração, que é comparado com um padrão, previamente calibrado (CALDAS *et al.*, 2015). A unidade utilizada é o grau Brix (°Bx). A medida de 1°Bx representa 1 g de compostos solúveis totais a cada 100 g de amostra. A Refratometria (RF) é apropriada para medidas rotineiras, com o objetivo de liberação de amostras para o laboratório de Controle da Qualidade ou em empresas de pequeno porte para controle final da produção, por apresentar resultados rápidos de maneira simples.

Caldas e colaboradores (2015) realizaram experimentos comparativos entre RF, espectrofotometria (método fenol-sulfúrico) e cromatografia líquida aplicadas à determinação de açúcares em néctar e em suco concentrado de uva. Os resultados demonstraram que a espectrofotometria não foi adequada para o controle de qualidade para determinação dos açúcares totais para este tipo de amostra, pois se diferenciou em relação à RF e CLAE apresentando valores significativamente maiores. A cromatografia, além de resultados concordantes em termos de açúcares totais, é a melhor técnica para quantificá-los separadamente, propiciando através do teor de frutose e glicose a verificação de adulteração do produto, mas o equipamento possui um alto custo. A RF mostrou-se a técnica mais adequada em rotina de processo, dada a sua precisão com menores erros relativos calculados, praticidade sem preparo de amostra e simplicidade do equipamento e da técnica, mas esta mede somente o total de sólidos solúveis sem discriminação e seletividade em termos de açúcares e tipo de produto.

### 3.2.2 Polarimetria

Os açúcares possuem carbonos assimétricos em sua estrutura, o que permite que estas moléculas desviem o plano de vibração da luz plano-polarizada. Devido às diferenças nas estruturas, o desvio da luz se dará de forma diferente para cada molécula (Tabela 2). Portanto, trata-se de uma propriedade característica que pode ser usada para auxiliar na caracterização e/ou quantificação dos açúcares. O polarímetro é um instrumento ótico capaz de medir o grau de rotação molecular.

Tabela 2 - Valores de rotação específica de alguns açúcares.

<b>Açúcar</b>	<b>Rotação Específica (<math>\alpha</math>)</b>
Sacarose	+66,5°
Glicose	+52,5°
Frutose	-92,5°

Fonte: IAL, 2008.

A polarimetria é um dos métodos oficiais para determinação de açúcares redutores e totais em alimentos, segundo a AOAC. Mas esta técnica exige condições específicas e existem sérias limitações se as atividades ópticas de outras substâncias presentes na amostra interferem na determinação polarimétrica. Este método é o mais adequado para determinação de amido, e

é o método recomendado pelo Ministério da Agricultura do Brasil, por ser o indicado pela Comunidade Europeia (MACHADO; CAMPOS; SOUZA, 2009).

### 3.2.3 Enzimático

Dentre os métodos enzimáticos, pode-se citar a metodologia enzimático-colorimétrica descrita por Bergmeyer e Bernt (1974) para a quantificação de glicose, que utiliza a enzima glicose oxidase, disponível em kits comerciais. Esta enzima, por sua vez, é responsável por catalisar a oxidação da glicose para ácido glucurônico e peróxido de hidrogênio. Por meio de uma reação oxidativa de acoplamento catalisada pela peroxidase, o peróxido formado reage com um grupo cromóforo doador de hidrogênio e o oxida a um derivado colorido, em que é possível realizar a leitura da absorbância em espectrofotômetro na região do visível.

Conforme Pereira *et al.*, (2008), o método enzimático desenvolvido para a quantificação espectrofotométrica do teor de glicose em amostras frescas de batata é prático, econômico e altamente específico para o analito. Os resultados indicaram que a metodologia apresenta seletividade, linearidade e precisão para ser utilizada com baixos teores de açúcares redutores.

### 3.2.4 Titulometria

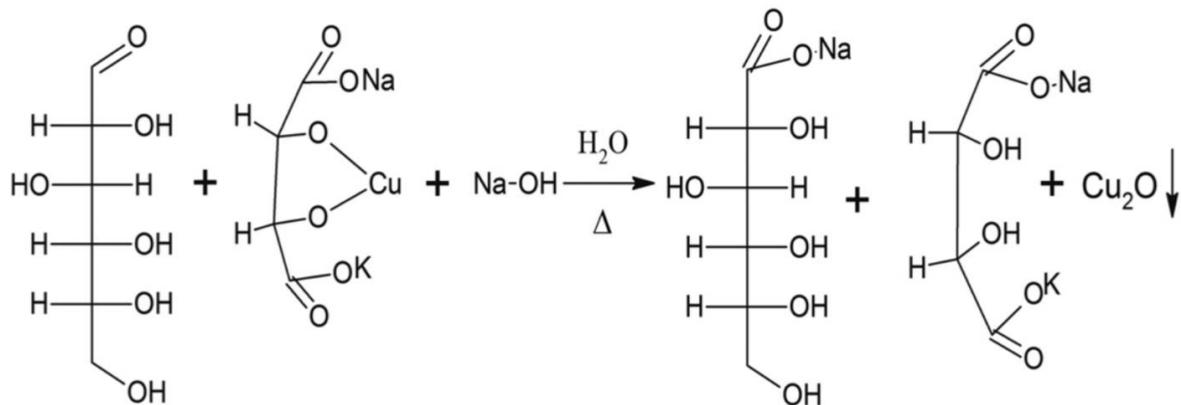
A titulometria baseia-se na quantidade de um reagente de concentração conhecida que é consumido por um analito, levando em consideração a estequiometria de reação envolvida. Nesta técnica são utilizadas etapas diferentes para a determinação AR e ANR. Para analisar açúcares não-redutores, é necessário realizar hidrólise prévia em meio ácido. A hidrólise, também conhecida por inversão, promove a alteração de uma substância complexa que é quebrada em moléculas menores em meio ácido ou com o uso de enzimas como catalisadores.

#### 3.2.4.1 Método de Lane-Eynon.

O método de Lane-Eynon (LANE; EYNON, 1923) também conhecido como Método de Fehling, consiste na redução completa dos íons cúpricos do reagente de Fehling (uma solução de ácido tartárico com cobre alcalino) a óxido cuproso, causada pelos açúcares redutores. Esta reação forma um precipitado vermelho de óxido cuproso. A solução inicial é azul, devido ao íon cúprico, e a amostra é gotejada em titulação até que a solução adquira coloração vermelho-tijolo. A leitura do ponto final da titulação é relativamente grosseira e

depende da sensibilidade e da prática do analista. Nesta reação, o tartarato de sódio e potássio forma um sal com  $\text{Cu}^{2+}$ , de coloração azul anil, que sofre redução e resulta em óxido cuproso, de coloração avermelhada. O monossacarídeo é oxidado e isto resulta em um sal sódico (DEMIATE *et al.*, 2002; TAVARES *et al.*, 2010). A reação é apresentada na Figura 1.

Figura 1 - Mecanismo da reação entre o monossacarídeo presente na amostra e o íon  $\text{Cu}^{2+}$ , que resulta na formação de precipitado de  $\text{Cu}_2\text{O}$ .



Fonte: Adaptado de Tavares et al. (2010)

Para atingir resultados exatos com a utilização dessa metodologia é necessário manter ebulição constante durante a titulação, para evitar que o óxido cuproso (de coloração avermelhada) seja oxidado pelo oxigênio presente no ar e passe à condição de óxido cúprico (de coloração azul). Além disso, devido à necessidade de aquecimento, a titulação deve durar no máximo três minutos, de modo a evitar a decomposição dos açúcares, proveniente do aquecimento prolongado.

Esta é uma técnica amplamente utilizada, mas pode apresentar erros devido a fatores como a preparação antecipada do reagente de Fehling, tempo de ebulição incorreto e erro no momento da adição dos reagentes. Além disso, a preparação da solução de Fehling é complexa e o tempo total de análise é longo. (FLEISCHER, 2017; GORBUNOVA; BAYAN; VOITSIKHOVSKAYA, 2010).

Esta metodologia é oficial no Brasil para a determinação de açúcares ou carboidratos, a qual é regulamentada para aplicação em bebidas, como os refrigerantes, pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) através da Instrução Normativa N° 24 de 08 de setembro de 2005 (BRASIL, 1986). O método de Lane-Eynon também é bastante utilizado para determinação de açúcares na uva, suco de uva, mosto e vinho, sendo descrito nos Métodos Analíticos do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008).

#### 3.2.4.2 Método Luff-Schoorl

No método Luff-Schoorl, o açúcar é oxidado, enquanto os íons  $\text{Cu}^{2+}$  são reduzidos a  $\text{Cu}^+$ . Este cátion precipita na forma de  $\text{Cu}_2\text{O}$  em meio alcalino e o excesso de  $\text{Cu}^{2+}$  é determinado por iodometria. A determinação de açúcares é feita a partir de um fator de conversão titulando-se uma solução de tiosulfato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  com uma solução padrão de glicose 1%. (MARQUES *et al.*, 2016; MARRUBINI *et al.*, 2017).

#### 3.2.4.3 Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)

No método complexométrico com EDTA, os açúcares presentes na amostra reagem com a solução de  $\text{Cu}^{2+}$ , e estes íons são reduzidos a  $\text{Cu}^+$ , que precipitam na forma de  $\text{Cu}_2\text{O}$ . A concentração residual de  $\text{Cu}^{2+}$  é então titulada frente a uma solução padronizada de EDTA (ACEVEDO *et al.*, 2018; MARQUES *et al.*, 2016). Para as determinações dos açúcares é utilizado um fator de conversão, calculado titulando-se uma solução padrão de glicose.

### 3.2.5 Reagente de Benedict

O Reagente de Benedict (também chamado de solução de Benedict) é um reagente denominado por um químico americano, Stanley Rossiter Benedict (BENEDICT, 1908). É usado como teste qualitativo para a presença de açúcares redutores. Este reagente permite inferir se um monossacarídeo ou dissacarídeo é um açúcar redutor, com objetivo semelhante ao teste de Tollens e Fehling. Faz uso de uma única solução de citrato de cobre (II) que não se deteriora tão rapidamente quando armazenado em relação ao reagente de Fehling.

O reagente de Benedict é uma solução alcalina contendo íons  $\text{Cu}^{2+}$  que são reduzidos a óxido cuproso, formando um precipitado vermelho (PATACA *et al.*, 2007).

A cor do precipitado obtido permite inferir semiquantitativamente sobre a quantidade de açúcar presente no Solução. Um precipitado esverdeado indica aproximadamente 0,5% de açúcar, precipitado amarelo indica 1%, laranja indica 1,5% e vermelho indica 2% ou concentração superior (DAVIS, 1963). A cor varia dependendo da quantidade de açúcar redutor na amostra. O teste de Benedict promoverá uma mudança de cor para qualquer mono ou dissacarídeo que contenha um grupo hemiacetal ou hemiacetona.

A solução de Benedict foi usada para testar a presença de açúcar em refrigerantes por Godwill *et al.*, (2015) mas a determinação foi realizada qualitativamente, proporcional a cor apresentada na reação.

Este reagente é usado como um detector de presença de glicose na urina, podendo indicar sinal de diabetes. Testar uma amostra de urina com o reagente de Benedict é uma maneira simples de verificar a presença de glicose em pessoas suspeitas de terem esta doença (BENEDICT, 1911; KUMAR; GILL, 2018; NIKOLELIS; PAPASTATHOPOULOS; HADJIIOANNOU, 1978).

Apesar das vantagens associadas ao uso desse reagente, como utilização de uma única solução e maior estabilidade química, não foram encontrados trabalhos empregando tal reagente para determinação de açúcares através de imagens digitais.

### **3.2.6 Gravimetria**

#### *3.2.6.1 Munson-Walker*

Fundamenta-se na quantificação da quantidade de precipitado de óxido cuproso formado após a redução de íons cobre bivalentes, em meio básico, pelos açúcares redutores (p. ex., glicose e frutose). As análises são gravimétricas e realizadas de acordo com Spencer e Meade, (1945) e o método 925.47 da AOAC (LATIMER JR., 2019). A determinação das porcentagens de açúcares é feita utilizando uma tabela de conversão fornecida pelos autores.

### **3.2.7 Espectrofotometria**

Os métodos espectrofotométricos permitem a determinação não somente de açúcares totais, mas é possível distinguir AR e ANR. Espectrofotômetros são instrumentos capazes de registrar dados de absorvância ou transmitância em função do comprimento de onda. O espectro de absorção é característico para cada espécie química, sendo possível a identificação de uma espécie química por seu “espectro de absorção”. A característica mais importante dos espectrofotômetros é a seleção de radiações monocromáticas, o que possibilita inúmeras determinações quantitativas regidas pela Lei de Lambert-Beer.

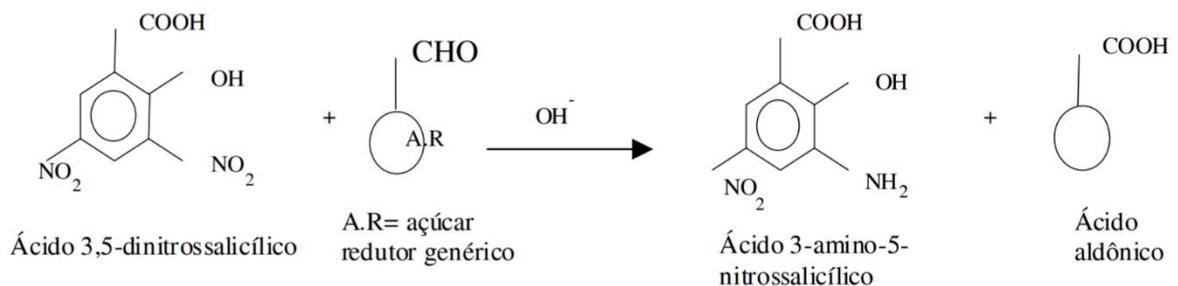
#### *3.2.7.1 Ácido 3,5-dinitrossalicílico (ADNS)*

O método espectrofotométrico descrito por (Miller (1959) para a análise de açúcares redutores se baseia na redução em meio alcalino, do ácido 3,5-dinitrossalicílico em ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, por ação dos açúcares redutores, dando origem a um complexo acastanhado que é avaliado espectrofotometricamente em 540 nm.

O ADNS é reduzido para ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, e o grupamento aldeído é oxidado a ácido aldônico. Entretanto a equivalência entre o amino-5-nitrossalicílico produzido e a quantidade do açúcar não é exata e diferentes açúcares produzem diferentes intensidades na cor desenvolvida. Isso sugere que a química da reação deva ser mais complexa que a apresentada na Figura 2, podendo estar relacionada com as reações de decomposição de açúcares em solução alcalina (MILLER, 1959).

O método ADNS é amplamente utilizado para estimar a concentração de AR em diferentes amostras (GONÇALVES *et al.*, 2010; SHAO; LIN, 2018; WOOD *et al.*, 2012; XIA *et al.*, 2015). É empregado na indústria fermentativa, na detecção de carboidratos nos mostos pois mostra-se importante não só no início do processo, para se saber o percentual teórico de etanol que pode ser obtido, como também durante e no fim da fermentação, para se avaliar a velocidade de consumo dessas fontes de carbono e o quanto de açúcar deixou de ser fermentado (DOS SANTOS *et al.*, 2017).

Figura 2 - Redução do ácido 3,5- dinitrossalicílico pelo açúcar, em meio alcalino, a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico formando ácido aldônico.



Fonte: Adaptado de SILVA *et al.*, (2003)

### 3.2.7.2 Antrona

A reação de antrona se baseia na ação hidrolítica e desidratante do ácido sulfúrico concentrado sobre os carboidratos (LUDWIG; GOLDBERG, 1956). Quando a reação é levada a efeito com carboidratos com ligações glicosídicas, estas são hidrolisadas e os açúcares simples desidratados para furfural ou hidroximetilfurfural. Essas substâncias se condensam com a antrona (9,10-dihidro-9-oxoantraceno) dando um produto de coloração azul intenso

(TREVELYAN; HARRISON, 1952). Os açúcares totais são quantificados por espectrofotometria em comprimento de onda de 620 nm, utilizando uma curva padrão de glicose.

#### 3.2.7.3 Método Fenol-sulfúrico

Baseia-se na determinação de açúcares simples, polissacarídeos e seus derivados incluindo os metil-ésteres com grupos redutores livres, após a desidratação dos mesmos pelo ácido sulfúrico e subsequente complexação dos produtos formados com o fenol. A mudança da cor da solução é medida na região do visível e é proporcional à quantidade de açúcares presentes na amostra (CALDAS *et al.*, 2015; DEMIATE *et al.*, 2002). A reação é sensível e de cor estável (DUBOIS *et al.*, 1956). Os teores de açúcares totais são determinados por espectrofotometria a um comprimento de onda de 490 nm utilizando-se uma curva padrão de glicose.

#### 3.2.7.4 Somogyi-Nelson

A análise colorimétrica de Somogyi-Nelson (MICHAEL, 1952; NELSON, 1944) é um exemplo de método químico, em que é possível quantificar AR. O método baseia-se na propriedade redutora dos açúcares sobre o cobre, presente no reativo. Os glicídios redutores aquecidos em meio alcalino, transformam-se em enedióis que reduzem os íons cúpricos presente a óxido cuproso. O óxido cuproso formado reduz o reagente arseno-molibídico a óxido de molibdênio de coloração azul cuja intensidade de cor é proporcional a quantidade de açúcares redutores existentes na amostra. O teor de açúcares redutores é calculado por espectrofotometria a 510 nm, utilizando-se uma curva padrão construída a partir de uma solução de glicose (KIM; SAKANO, 1996; LUO *et al.*, 2019; SHAO; LIN, 2018).

### 3.2.8 Cromatografia

A cromatografia é um processo mais complexo e preciso do que as metodologias que envolvem os processos supracitados para determinação de açúcares. Seu diferencial é a seletividade em relação aos diferentes monossacarídeos e dissacarídeos que são quantificados individualmente em uma única análise. A cromatografia pode ser combinada com diferentes sistemas de detecção, permitindo a determinação de diferentes compostos.

### 3.2.8.1 Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou em inglês, *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), tem sido amplamente utilizada na identificação e quantificação de compostos ativos em alimentos e bebidas. É uma técnica empregada na análise de diferentes açúcares, como a glicose, a frutose e a sacarose (MA *et al.*, 2015).

A identificação é realizada baseando-se nos tempos de retenção e adição de padrões à amostra. A quantificação é realizada por padronização externa utilizando-se curvas de calibração analíticas construídas a partir das áreas dos picos cromatográficos. As vantagens de sua utilização envolvem alta eficiência, sensibilidade e reprodutibilidade, mas limita-se a necessidade de profissional treinado e com experiência, solventes altamente puros e altos valores de equipamento e análise (CAPUANO; VAN RUTH, 2012).

### 3.2.8.2 CLAE com detector de índice de refração (CLAE-IR)

Também chamado de refratômetro diferencial, este sistema é conhecido como detector universal por apresentar respostas para qualquer espécie de amostra e por ser amplamente utilizado em ensaios para a determinação de teor de açúcares em diversas amostras. A análise baseia-se na mudança do índice de refração do eluente por causa dos componentes da amostra. Quanto maior a diferença do índice de refração entre a fase móvel e o componente da amostra, mais intenso é o sinal. A técnica cromatográfica permite quantificar diferentes açúcares em uma mesma corrida cromatográfica, como realizado por Caldas *et al.*, (2015).

ZIELINSKI *et al.* (2014) desenvolveram um método empregando CLAE-IR demonstrando ser rápido e eficiente para quantificação de açúcares (sacarose, D-glicose, D-frutose e D-sorbitol) presentes no suco de maçã. A preparação da amostra é simples, exigindo apenas diluição e filtração antes da injeção, e a fase móvel (água) utilizada gerou pequena quantidade de resíduos não tóxicos.

### 3.2.8.3 CLAE com detector do tipo eletroquímico.

Também conhecido como detector amperímetro, este modelo de detector é baseado na oxidação de alguns compostos quando submetidos a um potencial elétrico. Utiliza-se um par de eletrodos para aplicar a diferença de potencial elevado o suficiente para provocar uma reação de oxidação ou redução, que gera uma corrente e essa corrente é medida pelo detector

eletroquímico. A corrente gerada é proporcional à concentração do componente, sendo um dos melhores detectores em termos de quantidade mínima detectada (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2006).

Pico e colaboradores (2015) quantificaram glicose, isomaltose, maltose, maltotriose, maltotetraose e maltopentose em farinha de trigo por CLAE com detector eletroquímico.

No controle da qualidade do vinho em relação à quantidade de açúcares, ácidos orgânicos e álcoois, a CLAE apresenta preparo fácil da amostra, requer pequenas quantidades de amostra, não há necessidade de solvente orgânico, tempo de execução rápido e apresenta uma separação satisfatória da amostra que é muito complexa com baixa interferência da matriz (DE SOUZA *et al.*, 2019)

#### 3.2.8.4 *Cromatografia de íons com detector amperométrico (CLAE-AD)*

A cromatografia de íons pode ser considerada uma fusão de duas grandes áreas: a cromatografia líquida e a troca iônica. Ela tem sido amplamente utilizada pela indústria açucareira para fracionar mono e oligossacarídeos. Amplamente utilizada em sistemas de análise de fluxo devido à sua alta sensibilidade e simplicidade instrumental. Os açúcares, como eletrólitos fracos, mostram pouca interação com resinas de troca aniônica em meio aquoso. Essas interações são aumentadas com a formação de complexos de açúcar com boratos e o mecanismo de separação é principalmente troca iônica (VENTE *et al.*, 2005)

ZHU *et al.*, (2019) desenvolveram um método de CLAE-AD simples e sensível e validado para a determinação de dezenove açúcares em geleias real. As performances do método, em termos de número de açúcares detectáveis, faixa de calibração linear e sensibilidade, mostrou-se superior às do método CLAE-IR. O método proposto permitiu a determinação dos açúcares em menores concentrações, encontrados nas geleias reais, que dificilmente são identificados pela CLAE-RI.

#### 3.2.8.5 *Cromatografia gasosa com espectrômetro de massas*

O acoplamento de um cromatógrafo com o espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade). A cromatografia gasosa com espectrômetro de massas foi usada, por exemplo, como método qualitativo para identificar os tipos de açúcar em amostras de tâmaras. Os

resultados demonstraram que o suco analisado continha glicose, frutose e sacarose. Os resultados do GCMS determinaram os ensaios enzimáticos apropriados (ensaio enzimático padrão e medição da mudança de pH pelo analisador CL10) para quantificar os açúcares no suco de tâmaras, confirmando os açúcares identificados e fornecendo o teor de açúcar da amostra (AL-MHANNA; HUEBNER; BUCHHOLZ, 2018).

Na Tabela 3 é apresentada uma revisão com vários trabalhos com determinação de AR e ARN por diversos métodos.

Tabela 3 - Métodos de determinação de açúcares em diversas matrizes, disponíveis na literatura

(Continua)

<b>Amostra</b>	<b>Características</b>	<b>Método</b>	<b>Analito</b>	<b>Referência</b>
Algas	Método ADNS	Espectrofotométrico	Açúcar redutor	GARRIGA, 2017
Amostras sólidas (vegetais, frutas, cereais)	Solução de Fehling em cápsulas	Colorimétrico	Açúcar redutor	GORBUNOVA, 2010
Bebidas carbonatadas e leites fermentados	CLAE (AOAC)	Cromatográfico	Glicose, Frutose e Sacarose	CHOI <i>et al.</i> , 2011
Bebidas energéticas	Método ADNS	Espectrofotométrico	Açúcar redutor	HOSSAIN <i>et al.</i> , 2015
Caldo de cana	Equipamento REDUTEC, com modelo matemático		Açúcar redutor	MARQUES, 2016
Cerveja	Método Fenol-Sulfúrico e (Molisch's test)	Espectrofotométrico	Açúcar total	BOAHEN, 2015
Chocolate, farinha, biscoito e achocolatado	Método Luff-Schoorl (kit de ensaio K-SUFRG)	Enzimático	Sacarose e lactose	KOMES <i>et al.</i> , 2011
Leites vegetais (arroz, soja, aveia, amêndoa, quinoa)	NIR usando PLS e Luff-Schoorl	Titulométrico	Açúcar total	MARRUBINI, 2017
Mel	FT-IR		Açúcar redutor	PATACA, 2007
Morangos	CLAE x NIR-HSI	Cromatográfico	Frutose, glicose e sacarose	LIU <i>et al.</i> , 2019
Peras (fruta)	Vis-NIR, acoplado ao algoritmo de seleção por comprimento de onda.	Cromatográfico	Açúcar redutor	LI <i>et al.</i> , 2019
Refrigerantes	Densidade (comparativo com refrigerante zero)	Densimétrico	Sacarose aproximada	CAVAGIS, 2014
Refrigerantes	Método Knight e Alien e EDTA	Titulométrico	Baixo teor de açúcar redutor	ALOH <i>et al.</i> , 2015
Refrigerantes	Espectroscopia Raman e CLAE	Espectrofotométrico	Glicose, frutose e sacarose	ILASLAN, 2015

<b>Amostra</b>	<b>Características</b>	<b>Método</b>	<b>Analito</b>	<b>Referência</b>
Refrigerantes e suco de maçã	Método de ensaio baseado em nanopartículas de Ag (espectrofotômetro) e IC	Espectrofotométrico	Açúcar total	DELLA PELLE, 2019
Refrigerantes e sucos de frutas	Método baseado em PLS e ATR-IR	Espectrofotométrico	Glicose, frutose e sacarose e Açúcar total	RAMBLA <i>et al.</i> , 1998
Sacarose hidrolizada	Método espectrofotométrico CUPRAC x Reagente de Tollens	Espectrofotométrico	Açúcar redutor	DURMAZEL, 2019
Soluções de glicose	Reagente Benedict	Colorimétrico	Açúcar redutor	DAVIS, 1963
Suco de frutas, refrigerantes, mel, leite	Método espectrofotométrico CUPRAC x Método ADNS	Espectrofotométrico	Açúcar redutor	BASKAN, 2016
Suco de tâmaras, processo fermentativo	GC-MS e método enzimático	Cromatográfico e enzimático	Glicose, frutose, manose e sacarose	AL-MHANNA, 2018
Suco e néctar de uva	Refratometria, espectrofotometria e CLAE	Vários	Açúcares (natural e adicionados)	CALDAS, 2015
Tecidos lenhosos vegetais	Método fenol-sulfúrico	Colorimétrico	Açúcar Total e amido	CHOW, 2004
Vinho Colonial	Método ADNS	Colorimétrico	Açúcar redutor	Dos SANTOS, 2017

ADNS - Ácido 3,5-dinitrosalicílico

AOAC – Association of Analytical Chemists

ATR-IR - Espectroscopia no infravermelho com reflectância total atenuada (do inglês, *Attenuated total reflectance infrared spectrometry*)

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

CUPRAC – Capacidade antioxidante redutora cúprica (do inglês, *Cupric reducing antioxidant capacity*)

EDTA - Ácido etilendiaminotetracético

FT-IR- Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

GC-MS - Cromatografia gasosa com espectrometria de massa (do inglês, *Gas chromatography–mass spectrometry*)

IC - Cromatografia iônica (do inglês *Ionic chromatography*)

NIR – Espectroscopia no infravermelho próximo (do inglês *Near-infrared spectroscopy*)

NIR-HSI - Imagem hiperespectral no infravermelho próximo (do inglês, *near-infrared hyperspectral imaging*)

PLS – regressão por mínimos quadrados parciais (do inglês, *Partial least squares*)

RF – Refratometria.

Como observado na Tabela 3, além dos métodos anteriormente discutidos, a espectroscopia no infravermelho tem sido utilizada para a determinação de açúcares em alimentos (PAN *et al.*, 2015; SHETTY *et al.*, 2012) pois a determinação dos constituintes em alimentos é rápida e requer pouca ou nenhuma preparação de amostra (OLIVEIRA *et al.*, 2014; SYLVIE *et al.*, 2009).

Cabe ressaltar, no entanto que a espectroscopia no infravermelho *per si* não é capaz de fornecer informações quantitativas através de seus espectros, sendo necessária sua utilização em conjunto com a quimiometria (análise multivariada aplicada aos dados químicos) e um método analítico de referência. Para essa finalidade é construído um modelo multivariado que é capaz de relacionar os espectros de um determinado grupo de amostras e seus respectivos valores dos parâmetros já determinados através de análises de referências (SOROL *et al.*, 2010).

Os métodos espectroscópicos em geral, são vantajosos por permitirem uma análise não destrutiva, rápida, confiável e que necessita de pouca quantidade de amostra para a análise. O seu emprego resulta em métodos rápidos e exatos, aplicados amplamente no controle de qualidade de produtos alimentícios e em análises químicas (OLIVEIRA *et al.*, 2014). O método de espectroscopia no infravermelho se destaca como uma maneira rápida e precisa de obter a quantidade de açúcares diferentes (RAMASAMI *et al.*, 2004).

Conforme MORGANO *et al.* (2007) a espectroscopia no infravermelho próximo combinada com o método de calibração multivariada por mínimos quadrados parciais (PLS do inglês *partial least squares*) é uma técnica fácil e rápida na determinação do teor de açúcar total em amostras de café cru. As principais vantagens do método proposto quando comparado com o método tradicional gravimétrico são redução do tempo de análise, pouca manipulação das amostras, diminuição de resíduos químicos e redução do custo de análise.

### 3.3 QUIMIOMETRIA

A quimiometria é uma área multidisciplinar do conhecimento, em que a matemática e a estatística trabalham em conjunto na análise de dados de processos químicos, de natureza multivariada (FERRÃO *et al.*, 2004). Ela pode ser adotada para planejar e delinear experimentos, onde um maior número de informações a partir de dados oriundos das análises multivariadas pode ser obtido.

As ferramentas quimiométricas para o tratamento de dados são desenvolvidas de acordo com o interesse do estudo, seja para análise quantitativa ou qualitativa. Duas ferramentas

ganham destaque no contexto das aplicações analíticas: a) Reconhecimento de padrões /classificação e b) Calibração multivariada (CORREIA; FERREIRA, 2007).

### 3.3.1 Reconhecimento de padrões

Os métodos de reconhecimento de padrões têm como finalidade avaliar a existência de similaridades e diferenças entre diferentes grupos de amostras de acordo com suas características, muitas vezes obtidas através de análises químicas. Podem ser classificados em dois tipos: não-supervisionados e supervisionados.

Os métodos não-supervisionados são aplicados para fazer análise exploratória dos dados, no estágio inicial de uma investigação, tendo como objetivo encontrar ou identificar uma tendência. Os principais métodos deste tipo são: análise de grupo hierárquico (HCA, *Hierarchical Cluster Analysis*) e análise de componentes principais (PCA, *Principal Componentes Analysis*) (CORREIA; FERREIRA, 2007).

Os métodos supervisionados têm como objetivo construir modelos a partir de um conjunto de treinamento com grupos de amostras de natureza conhecida, e os principais métodos com grande aplicabilidade em problemas analíticos de classificação são: a análise discriminante linear (LDA, do inglês, *Linear Discriminant Analysis*), análise discriminante pelos mínimos quadrados parciais (PLS-DA, do inglês, *Partial least Squares-Discriminant Analysis*) e a modelagem independente e flexível por analogia de classes (SIMCA, do inglês, *Soft Independent Modeling of Class Analogy*) (NAES *et al.*, 2002).

### 3.3.2 Calibração Multivariada

Dentre os métodos de calibração multivariada, a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS, do inglês, *Partial Least Square*) tem como função construir um modelo matemático a partir de dados multivariados, para prever de forma rápida, propriedades de interesse das amostras, como parâmetros físicos ou químicos específicos. É um método de calibração multivariada de 1ª ordem em que as variáveis dependentes e as independentes são transformadas em variáveis latentes e, em seguida, correlacionadas entre si. O modelo final resulta do ajuste com os menores erros de calibração e previsão possíveis (DAMASCENO *et al.*, 2015).

O processo de calibração multivariada consiste basicamente em três fases: calibração, validação e previsão, onde são construídos modelos matemáticos, relacionando a matriz da

resposta instrumental ( $X_{cal}$ ) com um vetor que possui os valores de referência ( $y_{cal}$ , propriedade de interesse).

Na validação é realizada uma avaliação dos modelos de modo a verificar se estes são satisfatórios para a determinação das propriedades de interesse. Para isto são empregadas duas técnicas: a validação por série de testes que usa subconjuntos separados (calibração e validação) e a validação cruzada (*cross-validation*), que usa o conjunto de calibração.

Após o pré-processamento dos dados e aplicação do método PLS, parâmetros como erro quadrático médio de calibração (RMSEC, do inglês, *Root Mean Square Error of Calibration*), erro quadrático médio de previsão (RMSEP, do inglês, *Root Mean Square Error of Prediction*), coeficiente de correlação de Pearson ao quadrado ( $r^2$ ) e erro quadrático médio de validação cruzada (RMSECV, do inglês, *Root Mean Square Error of Cross Validation*), são calculados para aferir a qualidade dos modelos de regressão obtidos (GODINHO *et al.*, 2014).

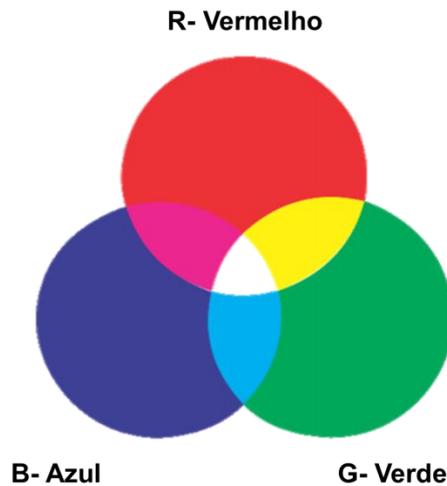
### 3.4 IMAGENS DIGITAIS

A imagem digital, em forma bidimensional, requer duas etapas indispensáveis, a aquisição e a digitalização (MARQUES FILHO; VIEIRA NETO, 1999). A aquisição ocorre por meio de dispositivos eletrônicos, como câmeras fotográficas, webcam, *smartphones*, dentre outros. Esses dispositivos captam uma cena real tridimensional e a convertem em uma imagem analógica (eletrônica). Essa conversão é realizada por um sensor (CCD<sup>2</sup> - *Charge Coupled Device* ou CMOS – *Complementary metal-oxide semiconductor*), que tem a função de converter a energia luminosa incidente sobre o objeto em sinal elétrico. Mas para que essa imagem possa ser processada no computador ou celular, a mesma deve ser digitalizada, onde cada ponto é denominado de pixel. Cada localização do pixel na imagem contém apenas um único valor numérico que representa o nível de sinal naquele ponto, sendo que esses níveis de cores podem variar de 0 a 255 (SOLOMON; BRECKON, 2011).

Em um sistema RGB (do inglês *Red, Blue and Green*), um pixel pode ser considerado um vetor, composto por três imagens monocromáticas, em que os componentes representam as intensidades de vermelho (R), verde (G) e azul (B) (Figura 3).

Utilizando informações simples das imagens, como os valores de cores baseadas no sistema RGB, consegue-se obter resultados analíticos similares àqueles adquiridos com instrumentação analítica, caracterizando esta estratégia em uma alternativa de menor custo para a realização de determinadas medidas instrumentais, como classificação de amostras baseadas em medidas colorimétricas (ASKIM; MAHMOUDI; SUSLICK, 2013).

Figura 3 - Representação gráfica do sistema RGB.



Fonte:<http://www.jbprint.com.br/blog/imgs/rgb.jpg>

A cor é um fenômeno psicofísico tridimensional. Ao definir um espaço de cores, as informações de cores podem ser transformadas em valores numéricos, dados da biblioteca de cores etc., que podem ser tratadas como informações analíticas. Ao tratar as cores como informações digitais, não apenas as “cores” podem ser usadas, mas também os algoritmos podem ser aplicados para extrair valores numéricos convertidos das informações das cores.

Com a ajuda de uma câmera, um *smartphone* e um *software* de processamento de dados, a imagem de milhares de amostras pode ser gravada e rapidamente transformada em um relatório de medição em um computador ou no próprio *smartphone*. A análise digital de cores ganhou destaque em diversos campos da medicina, química, biológica, de medicamentos e de alimento conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Trabalhos selecionados da literatura que utilizaram imagens digitais no visível.

(Continua)

<b>Amostra</b>	<b>Reator</b>	<b>Analito</b>	<b>Características</b>	<b>Referência</b>
Água	Papel de filtro Whatman	pH e nitrito	Determinação do pH e concentração de nitrito com uso de <i>smartphone</i>	(LOPEZ-RUIZ, 2014)
Água	Vials de vidro	Nitrito, fosfato, cromo e fenol	Imagens adquiridas com câmera de <i>smartphone</i>	(KILIÇ <i>et al.</i> , 2018)
Água do campo	Dispositivo em papel	Bactérias	Dispersão da <i>Escherichia coli</i> com imagens adquiridas com <i>smartphone</i>	(PARK, 2015)
Água de lençóis freáticos	Tubos	Fluoreto	Quantificação com <i>smartphone</i>	(LEVIN <i>et al.</i> , 2016)
Águas	Microplaca de poliestireno	Flúor	Colorimétrico com <i>smartphone</i> e aplicativo Photometrix.	(BAUMANN, 2019)
Águas	Cubetas	Fe(II) e hipoclorito.	Quantificação com <i>webcam</i> digital	(DANCHANA, 2020)
Soluções de concentração desconhecida de proteína	Cubetas plásticas	Proteína	Determinação da concentração na amostra colorimetricamente com <i>smartphone</i>	(GEE <i>et al.</i> , 2017)
Isotônico em pó	Cubeta plástica	Cloreto de ferro(III)	Quantificação com <i>smartphone</i> e câmera digital.	(KEHOE, 2013)
Cana de açúcar	Placa de porcelana	Cobre	Determinação do analito com câmera digital	(PESSOA, 2017)
Cerveja	Filme polimérico	Furfural	Determinação colorimétrica, com <i>smartphone</i>	(RICO-YUSTE, 2016)
Cultura de células animais	Papel filtro analítico	Glicose e lactato; carboidratos	Colorimétrico – controle de crescimento celular com <i>smartphone</i>	(IM <i>et al.</i> , 2016)
Drinks	Placas de porcelana	Etanol	Quantificação com câmera fotográfica digital	(BENEDETTI, 2015)

<b>Amostra</b>	<b>Reator</b>	<b>Analito</b>	<b>Características</b>	<b>Referência</b>
Frutas exóticas	Placas de porcelana	Ácido ascórbico	Quantificação do analito com imagens adquiridas com <i>smartphone</i>	(DOS SANTOS, 2019)
Leite	Cela de politetrafluoretileno	Acidez	Teste com alizarol usando um <i>smartphone</i> e aplicativo PhotoMetrix	(HELPER, 2018)
Macromoléculas biológicas	Cubeta de quartzo	Proteína (albumina sérica bovina), enzima catalase, carboidrato (glicose)	Aquisição da imagem com um acessório optomecânico integrado ao <i>smartphone</i>	(DUTTA <i>et al.</i> , 2017)
Saliva	Fitas de papel para teste de álcool	Etanol	Determinação com <i>smartphone</i>	(JUNG <i>et al.</i> , 2015)
Sangue	Tira comercial	Colesterol	Determinação com <i>smartphone</i>	(ONCESCU, 2014)
Soluções de peróxido de hidrogênio	Fitas de papel	Peróxido de hidrogênio	Determinação com <i>smartphone</i>	(SOLMAZ, 2018)
Soluções padrão de tampão pH	Papel indicador	pH	Sistema de detecção de pH colorimétrico usando um algoritmo de adaptação de cores com <i>smartphone</i>	(KIM, 2017)
Suco de maçã	Tira de teste de papel	Fungicida, ectoparasiticida	Determinação através de Fluorescência do Thiram, com <i>smartphone</i>	(MEI <i>et al.</i> , 2016)
Suplemento dietético	Cubetas de vidro	Ouro	Determinação da concentração de nano partículas com imagens adquiridas com <i>smartphone</i>	(CAMPOS, 2016)
Suplemento vitamínico	Placas de polipropileno	Sulfato ferroso	Análises quantitativas univariada e qualitativas multivariada, a partir da decomposição de imagens digitais com <i>smartphone</i>	(HELPER <i>et al.</i> , 2017)
Urina	Papel filtro	Glicose, proteína	Comparativo entre câmera de telefone, scanner e câmera digital.	(MARTINEZ <i>et al.</i> , 2008)
Urina	Tiras de teste de urina	Ácido Ascórbico, nitrito,	Detecção multi-analitos sobre papel Aquisição imagens com <i>smartphone</i> .	(HONG; CHANG, 2014)

<b>Amostra</b>	<b>Reator</b>	<b>Analito</b>	<b>Características</b>	<b>Referência</b>
		glicose, proteína, leucócitos, bilirrubina		

Em comparação com os métodos convencionais, a análise digital possui inúmeras vantagens, como o menor tempo de análise, potencial de operação *in situ* e análises em tempo real. Além disso, como os dados de cores digitalizados são facilmente integrados a algoritmos para processamento, a operação automatizada é possível (XIA *et al.*, 2015).

Na literatura, muitos trabalhos demonstram que a simples adição dos reagentes diretamente à amostra e com posterior geração de cor e realização das medidas por imagens podem fornecer resultados qualitativos tanto quanto quantitativos satisfatórios (SILVA NETO; FONSECA; BRAGA, 2016). Através de dispositivos comuns de captura de imagens digitais como câmeras, *webcams*, *scanners* e *smartphones*, usados para registrar imagens de uma reação colorimétrica, é possível realizar determinações quantitativas e qualitativas com desempenho adequado, sem a necessidade de instrumentos como espectrofluorímetros ou espectrofotômetros (BENEDETTI *et al.*, 2015; GOMES *et al.*, 2008; SILVA NETO; FONSECA; BRAGA, 2016), no qual a intensidade da cor desenvolvida é diretamente proporcional à concentração do analito (BENEDETTI *et al.*, 2015; SANTOS NETO *et al.*, 2019). Assim o sinal analítico está relacionado às medições da luz, em geral por reflectância na superfície dos reatores, em contraste com os métodos espectrofotométricos ou fotométricos que são baseados na transmitância ou medidas de absorbância (BENEDETTI *et al.*, 2015; SANTOS NETO *et al.*, 2019).

A maioria dos métodos colorimétricos com imagens digitais emprega o padrão de cores RGB, que utiliza cores primárias e o conceito fundamental de que mais de 16 milhões de cores podem ser empregadas com base em várias combinações dessas cores (DA SILVA LYRA *et al.*, 2014; GOMES *et al.*, 2008). O uso do padrão RGB como resposta analítica baseia-se no fato de que estes valores mudam proporcionalmente com a cor em uma reação colorimétrica. Estes valores podem ser usados diretamente para realizar uma análise quantitativa. (ANDRADE *et al.*, 2013; DA SILVA LYRA *et al.*, 2014; GAIAO *et al.*, 2006).

Oliveira e colaboradores (2013) aplicaram a análise na identificação de amostras de solos com concentrações de Cr(VI) superiores aos valores estabelecidos pelas legislações internacionais, a partir da análise de imagens digitais, entre eles o sistema RGB, adquiridas com o emprego de uma impressora multifuncional. As imagens foram tratadas com programas computacionais e também foi realizada a análise de componentes principais (PCA, do inglês *principal component analysis*). Os autores relataram que o método proposto é bastante simples e permite verificar se as concentrações de Cr nos solos foram superiores ou inferiores ao estabelecido por legislações de diferentes países.

Damasceno e colaboradores (2015) utilizaram a análise multivariada de imagens para estimar o pH de amostras de água potável a partir da mistura das amostras com o reagente azul de bromotimol e aplicação das informações do sistema RGB em modelo de calibração por PLS.

Lima e colaboradores (2013) introduziram a combinação de imagens digitais, obtidas com uma *webcam* e um sistema em fluxo do tipo *flow-batch* como uma nova estratégia para implementar análises químicas quantitativas. Esse sistema foi aplicado para a determinação de ácido tânico em amostras de chá-verde, empregando o método de tartarato ferroso, com desempenho analítico satisfatório, além de permitir uma redução significativa no consumo de reagentes e amostras, assim como a diminuição na geração de resíduos. O dispositivo é de baixo custo com alta frequência de análises (cerca de  $190 \text{ h}^{-1}$ ).

Na última década, a ampla adoção da tecnologia de *smartphones* estimularam o interesse da pesquisa em projetar produtos químicos e sensores integrados a estes aparelhos. Esses sensores portáteis são projetados para identificar a presença e concentração de analitos químicos e biológicos com base em suas interações com agentes específicos, como corantes, enzimas e anticorpos.

Os dispositivos com *smartphone* tem sido usados como simples leitores ou um instrumento com sensores totalmente interligados, atuando como detectores, processadores de dados e indutores de sinal em um único pacote (MCCRACKEN; YOON, 2016). Com as rápidas melhorias no *hardware* óptico dos *smartphones* foi possível acoplar plataformas de sensores ópticos independentes para aplicativos baseados em colorimetria, fluorescência, espectroscopia, espalhamento e microscopia (RODA *et al.*, 2016), resultando em aplicações eficazes que antigamente eram restritas a equipamentos específicos, como os colorímetros, espectrofotômetros e fluorímetros.

O desenvolvimento de técnicas de análise baratas, rápidas e robustas são de grande importância. Essas análises, realizadas através de aplicativos para *smartphone*, capturam e analisam imagens digitais através de modelos matemáticos. Entre estas opções, podem ser realizadas análises univariada e multivariadas como a PCA, análise de agrupamentos por métodos hierárquicos HCA e PLS (HELFER *et al.*, 2017).

Pesquisas recentes demonstraram particular interesse em adaptar as técnicas de análise por *smartphone* para lugares ou regiões com “recursos limitados”, como locais em regiões rurais ou em desenvolvimento. Em tais circunstâncias a infraestrutura de laboratório não é possível, pois demanda muitas vezes de eletricidade, refrigeração, iluminação controlada e equipamento estacionário de precisão, onde fatores variáveis como iluminação, temperatura e umidade do ambiente podem interferir drasticamente com ensaios químicos e de biossensores

(CHOI *et al.*, 2016). A captura das imagens pode ser realizada através da câmera do próprio dispositivo ou através de uma câmera USB conectada ao dispositivo, permitindo o processamento em aplicativo dedicado para *smartphone* (HELFER, 2020).

Na literatura existem vários métodos colorimétricos que foram aplicados juntamente com os *smartphones*. XIA *et al.* (2015) propuseram um método para detecção de glicose sensível e rápido, com base na análise colorimétrica. Este método apresentou elevada sensibilidade, possuindo uma grande faixa de detecção (0–10 g L<sup>-1</sup>) e baixo tempo despedido para análise, onde foi possível analisar 150 amostras em apenas 15 min com concordância superior a 99,8% em relação ao método ADNS.

Costa, Neiva e Pereira (2019) propuseram um método para especiação e determinação de Cr em amostras de couro usando imagens digitais e *smartphone*. A determinação de elementos inorgânicos como o Cr ainda é realizada por espectrometria de absorção atômica, cuja instrumentação possui elevado custo e não está disponível em todos os laboratórios. O método com imagens digitais mostrou-se bastante eficiente, com recuperações na faixa de 98-124% e apresentou limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) de 0,6 e 2 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente.

Tôrres *et al.*, (2011) exploraram um método baseado no uso de imagem digital para a determinação da acidez em vinhos tintos por meio de uma titulação ácido-base sem uso do indicador ou pré-tratamento da amostra, já que estão presentes compostos que mudam de cor com a variação da acidez. As amostras de vinho foram analisadas e os resultados foram comparados com o método de referência (potenciométrico) e não foram encontradas diferenças estatísticas significantes entre os resultados.

Apesar da praticidade dos *smartphones* para captura das imagens, em muitos trabalhos o processamento das mesmas não se dá diretamente no dispositivo. Dessa forma, um aplicativo gratuito de análise colorimétrica para *smartphones* denominado *Photometrix* foi desenvolvido e está disponível em plataforma digital para *download* (HELFER, 2015, [www.photometrix.com.br](http://www.photometrix.com.br)). O *Photometrix* captura e analisa imagens digitais através de modelos matemáticos e podem ser realizadas análises univariada e multivariada como PCA, HCA e PLS. A captura das imagens pode ser realizada através da câmera do próprio dispositivo (versão PRO), ou através de uma câmera USB conectada ao *smartphone* (versão UVC).

O aplicativo *Photometrix* possui a capacidade de calibração em diferentes escalas de cores, sendo que isso não é possível com outros aplicativos disponíveis, que permitem apenas a calibração em uma escala de cor, dessa forma, limitando sua aplicação em vários métodos colorimétricos (HELFER *et al.*, 2017; HELFER, 2015). Para tanto, ferramentas quimiométricas

estão disponíveis no aplicativo, tais como a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS). Porém apesar dos recursos dos métodos analíticos baseados em smartphones, algumas limitações de hardware prejudicaram a qualidade e a disseminação dos métodos analíticos desenvolvidos. A lâmpada e o detector usados nesses dispositivos são os mesmos que os disponíveis no smartphone, podendo haver diferenças entre modelos e fabricantes de smartphones, o que levou à construção de dispositivos personalizados, para que haja uma padronização da câmera, iluminação e condição de captura de imagem de um smartphone para outro.

No aplicativo Photometrix UVC, o uso de uma câmera externa conectada a um smartphone via conexão USB permite a construção de um dispositivo que possa superar essas limitações. A conexão USB é viável para todos os smartphones e é adequada para operar dispositivos baratos, totalmente disponíveis e miniaturizados, como câmeras endoscópicas. Esses tipos de câmeras estão disponíveis comercialmente e a baixo custo. A intensidade da luz pode ser ajustada para permitir a captura de imagens adequadas. Um orifício é projetado para permitir a introdução de frascos fechados ou até de cubetas descartáveis. Esta versão, utilizando uma câmera USB e o processamento de imagens, permite uma solução completa para análise de campo.

Grasel e colaboradores (2016) utilizaram o PhotoMetrix para a identificação de taninos em plantas e sementes. A análise foi realizada de forma multivariada e as imagens foram analisadas utilizando os histogramas RGB e canais de matiz, saturação e intensidade (HSI). Para classificação as amostras foram dispostas em grupos através do PCA.

Em outro estudo usando PhotoMetrix, Helfer et al., (2017) propuseram um método simples para determinação de ferro em suplementos, onde a determinação foi realizada no modo univariado e a diferenciação entre lotes das amostras foi realizada no modo multivariado empregando o PCA.

Na Tabela 5 visualizamos alguns trabalhos realizados com o aplicativo Photometrix.

Tabela 5 – Aplicações já efetuadas com o aplicativo Photometrix para determinações analíticas.

<b>Amostra</b>	<b>Analito</b>	<b>Versão</b>	<b>Referência</b>
Águas de abastecimento	Fluoreto	PRO e UVC	(BAUMANN <i>et al.</i> , 2019)
Águas subterrâneas e abastecimento	Determinação de Fluoretos e Fósforo	PRO	(BEN DA COSTA, 2019)
Couro	Especiação de Cr e determinação de Cr(VI)	PRO	(COSTA, 2019)
Extrato comercial de taninos	Polifenóis	PRO	(GRASEL <i>et al.</i> , 2016)
Fertilizantes	Fosfato	PRO	(SOUZA, 2019)
Leite	Acidez (alizarol)	PRO	(HELPER, 2018)
Leite	Adulterantes (cloretos, amido, peróxido de hidrogênio e hipoclorito)	UVC	(HELPER, 2020)
Suplementos vitamínicos	Ferro	PRO	(HELPER, 2017)

Sendo assim, pode-se verificar que é inédita a investigação quantitativa de açúcares, utilizando um método colorimétrico e smartphone conectado a uma câmera USB, e a utilização do aplicativo Photometrix UVC.

#### **4 PARTE EXPERIMENTAL**

Neste item está descrito, na forma de manuscrito, o experimento que foi realizado com base no enfoque do trabalho.

#### 4.1 MANUSCRITO

# **Manuscrito: Smartphone-Based Miniaturized, Green and Rapid Methods for the Colorimetric Determination of Sugar in Soft Drinks.**

Manuscrito formatado para submissão ao periódico *Food Chemistry*  
(Fator de Impacto: 5.399, Estrato Qualis A1)

1  
2 **Smartphone-Based Miniaturized, Green and Rapid Methods for the Colorimetric**  
3 **Determination of Sugar in Soft Drinks**

4 Sandra K. Schlesner<sup>a</sup>, Mônica Voss<sup>a</sup>, Gilson A. Helfer<sup>b</sup>, Adilson B. Costa<sup>c,d</sup>, Alexandre J.  
5 Cichoski<sup>a</sup>, Roger Wagner<sup>a</sup>, Juliano S. Barin<sup>a\*</sup>

6  
7  
8 *<sup>a</sup> Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa*  
9 *Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil*

10 *<sup>b</sup> Departamento de Computação; <sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação em Sistemas e Processos*  
11 *Industriais, <sup>d</sup> Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental, Universidade de Santa Cruz*  
12 *do Sul, Santa Cruz do Sul, RS 96815-900, Brazil*

13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20 \*Corresponding author: Tel/Fax: +55-55-3220 9445

21 *E-mail address (Juliano S. Barin): juliano@ufsm.br*  
22

23 **ABSTRACT**

24 Total sugar content of soft drinks was determined in a 3D-printed chamber equipped with an USB  
25 camera attached to the smartphone to take pictures directly from the vessels used for the reaction of  
26 monosaccharides with cupric ion from Benedict's reagent. The free applicative PhotoMetrix UVC  
27 was used to control the device and process images. Reaction time, total volume of solution and  
28 illumination were evaluated. Images were captured before and after centrifugation and the results  
29 were compared with official method (AOAC 923.09, Lane-Eynon titration). Partial least squares  
30 calibration was used reaching suitable values ( $R^2$  above 0.99; RMSEC and RMSECV values lower  
31 than 0.07 and 0.23 mg mL<sup>-1</sup>, respectively). The proposed methods presented agreements from 95.3 to  
32 108.7% to official one. Hundreds of samples can be analyzed in one hour and reductions in energy  
33 expenditure by 5.5 times and waste volume by 78 times were obtained in relation to the AOAC  
34 method.

35

36

37 **Keywords:** mobile phone; digital images; portable device; reducing sugar; colorimetry

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

## 49 **Introduction**

50           The sugar content of soft drinks is often determined using classical methods based on the  
51 reduction properties of monosaccharides. In such methods, a previous hydrolysis is carried out and  
52 the amount of reagent consumed or reduced by monosaccharides could be determined using  
53 spectrophotometry (e.g., dinitrosalicylic acid and Somogyi-Nelson methods) (Başkan et al., 2016;  
54 Hossain et al., 2015; Shao & Lin, 2018), gravimetry (e.g., Munson-Walker method)(Silva et al., 2006;  
55 Spencer & Meade, 1945) and titration (e.g., Lane-Eynon and Luff-Schoorl methods) (Komes et al.,  
56 2011; Lane & Eynon, 1923; Taufik & Guntarti, 2009). Despite the features as low complexity and  
57 the use of low-cost apparatus, these methods require excessive handling and a long time for analysis,  
58 impairing their use for continuum monitoring during industrial processes. In addition, high amounts  
59 of reagents are consumed and residue is generated. Therefore, the development of alternative greener  
60 methods is desirable (Gałuszka et al., 2013)

61           In this way, high performance liquid chromatography (HPLC) (Choi et al., 2011), infrared  
62 spectroscopy (Ramasami et al., 2004), gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) (Al-Mhanna  
63 et al., 2018) and enzymatic methods (Al-Mhanna et al., 2018) has been used for sugar determination  
64 in beverages (e.g., carbonated, fermented and plant-based milk ones) (Başkan et al., 2016; Choi et  
65 al., 2011; Garrigues et al., 1998; Marrubini et al., 2017; Rech et al., 2018) . Despite the features related  
66 to selectivity and accuracy of such methods, they demand specialized analysts and instrumentation,  
67 which lead to high operational costs and limited a broader use (Gorbunova et al., 2010; Xia et al.,  
68 2015)

69           Digital image-based (DIB) analytical methods have been proposed for analysis of natural and  
70 drinking water (Baumann et al., 2019; Hussain et al., 2016; Lopez-Ruiz et al., 2014; Park & Yoon,  
71 2015), as well as distilled and fermented alcoholic beverages (Benedetti et al., 2015; Ferreira et al.,  
72 2020; Oliveira et al., 2017, 2018; Tischer et al., 2017; Voss et al., 2019). For this purpose, images in  
73 the infrared and visible range could be obtained using portable devices as digital cameras, **but**  
74 smartphone-based chemical analysis has gained a broader use due to the possibility to perform image

75 capturing and processing in the same device. Furthermore, the smartphones could be easily adapted  
76 in-house to fulfill the requirements of each application (e.g., by using 3D printers) (Danchana et al.,  
77 2020), leading to customizations that escape from the devices offered only by commercial instrument  
78 manufacturers (Baumann et al., 2019; Helfer, 2020).

79 Colorimetry is by far the most used approach for DIB applications, which is based on reactions  
80 that lead to color changes. However, illumination conditions are often critical to obtain suitable results  
81 and special devices have been developed to overcome such limitations (Benedetti et al., 2015; Dutta  
82 et al., 2017; Hong & Chang, 2014; Kim et al., 2017; Martinez et al., 2008; Solmaz et al., 2018).  
83 Another important limitation is the analytical method transfer among smartphones, because some  
84 devices for image capture are not interchangeable. In addition, some methods proposed in the  
85 literature proposed reactions in open systems that exposed smartphones directly to reagents or solvent  
86 vapors, which could reduce the useful life of such equipment (Dutta et al., 2017; Helfer et al., 2018).

87 Helfer et al., (2020) proposed the use of a USB endoscopic camera attached to a 3D-printed  
88 closed chamber under controlled illumination to overcome such limitations. A hole was provided to  
89 allow the introduction of disposable closed vials and a free android app (PhotoMetrix UVC) was  
90 developed to reach a full solution for DIB analysis. This new tool was applied for crude milk samples  
91 to determine adulterants (chloride, hydrogen peroxide, hypochlorite, and starch) based on reactions  
92 commonly used for visual qualitative tests. Moreover, all analytical operations could be easily  
93 performed in a portable device, which could be adapted to any smartphone via USB connection. An  
94 important feature of the app was the possibility to use some chemometric tools (e.g., partial least  
95 squares regression, PLS) for data processing, which allowed the use of reactions that provide different  
96 colors for different concentration of analyte (Ben da Costa et al., 2019; Benedetti et al., 2015; Böck  
97 et al., 2018).

98 Therefore, in this work a rapid determination of sugar in soft drink and tonic water was  
99 proposed using an endoscopic camera adapted to a 3D-printed device connected to the smartphone  
100 via USB. Colorimetric reactions were performed using Benedict's reagent (Benedict, 1908) in 2 mL

101 disposable vials, and the images were captured directly at their bottom part. Experimental parameters  
102 as reaction time, total volume of solution and illumination were evaluated and the results obtained  
103 were compared with reference method (AOAC 923.09 (Horwitz & Latimer, 2019)). Image capture  
104 was evaluated immediately after reaction and after a centrifugation step using the free android app  
105 PhotoMetrix UVC. Green analytical procedure index (GAPI) (Płotka-Wasyłka, 2018) was used for  
106 the evaluation of the greenness of the proposed methods and compare them to the reference one.

107

## 108 **2. Materials and Methods**

### 109 **2.1 Samples and Reagents**

110 Samples of sweetened carbonated beverages of cola, guarana, lemon and orange, as well as  
111 tonic water (quinine) were purchased in the local market of Santa Maria, RS, Brazil. Benedict's  
112 reagent (Dinâmica, Brazil) was used for reactions, and it was composed by sodium citrate, sodium  
113 carbonate and copper sulfate. Reference solutions were prepared using D-Sucrose P.A. (Alphatec,  
114 Brazil). Purified water (Direct-Q 3 UV, 18.2 MΩ cm, Millipore Corp., Bedford, MA, USA) was used  
115 to prepare all solutions. Hydrochloric acid (Alphatec, Brazil), sodium hydroxide and anhydrous  
116 sodium sulfate (Vetec, Brazil) were used in sample preparation, moreover the lead acetate (Vetec,  
117 Brazil) was used to clarifying the colored samples. Methylene blue (Vetec, Brazil) was used as  
118 indicator in reference titration method. Fehling A and B reagents were prepared using copper sulfate,  
119 sodium and potassium tartrate and sodium hydroxide (Vetec, Brazil) according to AOAC 923.09  
120 method.

121

### 122 **2.2 Instrumentation**

123 Ultrathermostatic bath (model NI1223, Nova Instruments, Brazil) was used for the hydrolysis  
124 of sugar before the determination step for both proposed and reference methods. Magnetic stirrer  
125 (THELGA, Brazil) and a glass burette ( $50 \pm 0.05$  mL) were used for degassing samples and for  
126 titration according to the reference method (AOAC 923.09 (Horwitz & Latimer, 2019)).

127 A centrifuge (model MSE Micro, Centaur, England) was used to remove the insoluble  
128 precipitate after reaction between Benedict's reagent and reducing sugar. In all colorimetric analysis,  
129 digital images were obtained using an endoscopic camera (SmartCam, model Intelligent Endoscope,  
130 7 mm, and resolution of 640 x 480 pixels) connected to a smartphone (model Nexus 5, LG, USA) via  
131 USB connection. The USB camera was positioned laterally inside the chamber containing a white  
132 LED lamp for illumination with light intensity control. A hole in the center of the workpiece was used  
133 for the introduction of a transparent polypropylene vial (Eppendorf type, 2 mL, Cralplast, Brazil).  
134 The chamber was manufactured in polylactic acid using a 3D printer according to Helfer et al., (2020).

135 Images in the region of interest (ROI) of 64 x 64 pixels were captured after the colorimetric  
136 reaction and processed using a smartphone equipped with free software PhotoMetrix UVC version  
137 1.0.7 (GHELPER.NET Inc.), available in Google Play store. The multivariate calibration mode by  
138 PLS regression was selected in the software using RGB histogram values.

139

### 140 **2.3 Sugar determination by the reference method**

141 For the determination of total sugar in soft drinks the AOAC 923.09 method was used, which  
142 is equivalent to the Brazilian reference one (IAL 039/IV(Instituto Adolfo Lutz, 2008; BRASIL,  
143 2005). Samples were degassed by magnetic stirring during 5 min. After, an aliquot of 5 mL was  
144 transferred to a 100 mL volumetric flask and filled to the mark with purified water. The colored  
145 samples were discolored using a 1.5 mL of lead acetate saturated solution (20%, w/v) and sodium  
146 sulfate (AOAC, Method 925.46 B (d))(Horwitz & Latimer, 2019) followed by filtering to remove of  
147 precipitate. Then, 50 mL of samples were hydrolyzed using 1 mL of the 1 mol L<sup>-1</sup> HCl solution under  
148 heating (100 °C for 30 min). Hydrolyzed samples were cooled in room temperature (24 ± 1 °C),  
149 neutralized using 0.6 mL of 2 mol L<sup>-1</sup> NaOH (AOAC, Method 923.09 A(c))(Horwitz & Latimer,  
150 2019), and filled to the mark with purified water in 100 mL volumetric flask. Determination of the  
151 sugar content was performed according to official method (AOAC 923.09, Lane-Eynon Method),

152 using Fehling A and B solution under boiling until the color of solution change from blue to colorless  
153 (AOAC 923.09 C). The analysis was performed in triplicate ( $n = 3$ ).

154

#### 155 **2.4 Smartphone-based sugar determination**

156 The experimental conditions were evaluated before the determination of total sugar in the  
157 samples. Experimental data was evaluated using the Protimiza Experimental Design Software  
158 (Campinas, Brasil, 2005) with a Central Composite Design (CCD) to obtain the most suitable  
159 parameter of color intensity (RGB). In supplementary material (Table S1), the complete matrix for  
160 the experimental design is shown with the codified levels and true values. The design presented two  
161 independent variables: lighting ( $x_1$ ; 2 to 74 lux) and total volume inside the vial ( $x_2$ ; 0.396 to 1.104  
162 mL). The response studied were the values for Red ( $Y_1$ ), Green ( $Y_2$ ) and Blue ( $Y_3$ ) channels. The  
163 experimental design was composed of 12 experiments with four replicates of the central point and  
164 that was performed randomly and with four readings ( $n = 4$ ) in each experiment. The control of light  
165 intensity of LED lamp was measured in five values using free mobile software (CPU-Z for Android,  
166 version 1.29, 2019), available on Google Play.

167 In these experiments no samples were used and only a 1:1 (v/v) mixture of distilled water and  
168 Benedict's reagent was prepared in the vials. The significance of the factors was assessed by means  
169 of analyses variance (ANOVA) and the model was verified by the significant regression statistic,  
170 lack-of-fit and coefficient of determination ( $R^2$ ). The conditions for the measurement were set to  
171 high intensities of R, G, and B.

172 Sample preparation for the smartphone-based method was performed according to reference  
173 method (AOAC 923.09) as described previously in section 2.3. However, the determination of the  
174 total sugar was performed directly in vial after sample preparation (hydrolysis procedure), using 0.75  
175 mL of sample or reference solutions plus 0.75 mL of Benedict's reagent, as showed in Fig. 1. The  
176 solutions were mixed and heated in water bath at 90 °C during 5 min to complete the reaction.

177

**Figure 1**

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

Afterwards, the samples were removed from the bath and two different approaches were used for the color measurement of solutions: *i*) direct reading without centrifugation (direct reading, DR), and *ii*) reading after centrifugation (with centrifugation, WC - 1 min at 13,000 rpm) using 0.50 mL of supernatant. Calibration curves were constructed with solutions of hydrolyzed sucrose in concentrations ranging from 0.5 to 2.5 mg mL<sup>-1</sup>. Images (64 x 64 pixels) were captured (n=4) after the reaction with Benedict's reagent and processed using a smartphone equipped with PhotoMetrix UVC, version 1.0.7. The partial least squares (PLS) model was selected in the software using RGB histogram values. The step-by-step sequence in the software is described in supplementary material (Figure S1).

189

190

191

192

The vials containing the solutions were inserted in the chamber, and the images were captured under controlled illumination without interference of ambient light considering the values obtained from experimental design.

193

**2.5 Statistical evaluation**

194

195

196

197

198

199

200

201

202

The PLS regression results were evaluated according to the coefficients of determination ( $R^2$ ), slope, offset, root mean squared error of calibration (RMSEC), root mean squared error of cross validation (RMSECV), and root mean squared error of prediction (RMSEP). The LOD ( $3\sigma$ ) and LOQ ( $10\sigma$ ) were calculated considering the average of the blanks according to Eurachem Guide (Magnusson & Örnemark, 2014). Accuracy was evaluated by the comparison of results obtained with the proposed method with AOAC 923.09 method. The data were evaluated using analysis of variance (ANOVA) followed by Student's t- test at the 5% level of significance ( $p > 0.05$ ) using GraphPad InStat®, version 3.0.

203

**2.6 Greenness evaluation of analytical methods**

204 Greenness evaluation was performed by the GAPI method that is based on the use of 5  
205 pictograms subdivided in 3 or 4 regions internally. Several information could be obtained from these  
206 images, since each one receives colors (green, yellow and red) for depicting low, medium or high  
207 environmental impact involved for each step of analytical methodology. The information used to  
208 evaluate the green characteristic of the analytical method had the aspects related from the sample  
209 collection to the disposal of the waste generated for the environment, in addition to the energy  
210 efficiency of the analytical method (Płotka-Wasyłka, 2018). The values used in GAPI for each  
211 analytical method were reported in supplementary material (Table S2).

212

### 213 **3. Results and Discussion**

#### 214 **3.1 Evaluation operational parameters for smartphone-based determination of sugar**

215 The reaction time (1 to 5 min) between Benedict's reagent and sugar under heating was  
216 evaluated. Initially, the Benedict's reagent is blue, but during the heating  $\text{Cu}^{2+}$  ion is reduced with the  
217 formation of red-colored precipitates of  $\text{Cu}_2\text{O}$ . The color of the mixture depends on the content of  
218 reducing sugar and different colors (green, yellow or red) could be formed due to different amounts  
219 of  $\text{Cu}_2\text{O}$  (Benedict, 1908). However, if centrifugation is used the blue color is observed only in  
220 different intensities, according to the amount of  $\text{Cu}^{2+}$  ion that remains in solution after reaction with  
221 sugar. It was observed (supplementary material, Figure S2) that in for 1 and 2 min the reaction was  
222 incomplete, but after 5 min the reaction is completed, and the red precipitate is clearly observed. The  
223 calibration model for 5 min of reaction also presented the better results in the parameters with  
224 RMSEC, RMSECV and RMSEP values of 0.04, 0.19 and 0.07  $\text{mg mL}^{-1}$ , respectively. In such  
225 conditions, the recoveries were from 92.8 and 104.4% and 5 min in water bath was chosen as reaction  
226 time for all experiments using smartphone.

227 Before sugar determination an experimental design was used with two independent variables,  
228 lighting (Lux) and volume of solution inside the vial (mL) to identify the suitable conditions for image

229 capture. Values of the color intensity, from twelve CCD experiments are represented in the  
230 supplementary material (Table S3).

231 According to the results obtained by ANOVA showed in supplementary material (Table S4),  
232 it was observed that low coefficients of determination ( $R^2$ ) in the range 0.63 to 0.70 for the RGB  
233 values were obtained. Therefore, the RGB parameters indicated that only 62.58 to 69.93 % of the  
234 variables are explained by the model.

235 The results obtained provide the generation of a mathematical model, it was observed that  
236 when more intense lighting is applied, there is a reading of higher RGB values. Therefore, this  
237 variable presented influence in the analytical response.

238 The illumination ( $x_1$ ) is the most significant parameter ( $p < 0.05$ ;  $R=0.0029$ ;  $G= 0.0030$  and  
239  $B= 0.0069$ ), while the volume ( $x_2$ ) was not a significant variable ( $p > 0.05$ ;  $R= 0.4589$ ;  $G= 0.4377$   
240 and  $B= 0.8480$ ), as shown in supplementary material (Table S5). According to the set of results  
241 obtained, maximum illumination (74 lux) was used because it presented the higher intensity for RGB  
242 channels (Table 2). The volumes evaluated presented no difference, so the volume of 0.5 mL was  
243 chosen for all determinations because it requires lower volume of samples and generates a reduced  
244 amount of residue.

245 For image capture two approaches were used: DR and WC. For the DR analysis, the samples  
246 were read immediately after the removal of the water bath. They were not cooled, because the  
247 precipitation of the  $\text{Cu}_2\text{O}$  is fast, but it avoids centrifugation for phase separation and the transfer of  
248 the supernatant aliquot to other tube as in WC. However, WC presented greater stability of color that  
249 allowed more time for image capture than DR process.

250 The results from the PLS models to determine sugar of soft drink are summarized in Table 1.  
251 The regression models were developed using 20 to 24 samples for calibration in DR and 19 to 24  
252 samples for WC, respectively. The most suitable results in relation to calibration (RMSEC) and cross  
253 validation (RMSECV) errors were obtained with 3 and 5 factors, presenting values less than 0.07 and  
254  $0.23 \text{ mg mL}^{-1}$ , respectively.

255

256

**Table 1**

257

258

259

260

261

262

263

264

**Figure 2**

265

266

**3.2 Sugar determination in soft drinks**

267

268

269

270

271

272

273

274

275

276

277

**Figure 3**

278

279

**3.3 Greenness evaluation**

280 A comparison of the aspects of green analytical chemistry of DR, WC and the official AOAC  
281 923.09 method was carried out based in green analytical procedure index (GAPI). This is a new tool  
282 recently proposed to evaluate analytical methods from sample collection to the final determination of  
283 analytes and waste disposal steps. All data considered for this evaluation were presented in  
284 supplementary material (see Table S2). The results of the comparison among the AOAC, UVC-DR  
285 and UVC-WC are shown in Fig.4.

286

287

#### Figure 4

288

289 The first pictogram is related to sample collection, preservation, transport and storage, which  
290 were similar to all methods. The second pictogram was used to evaluate sample preparation. In both  
291 methods sample preparation was required, for sucrose hydrolysis was necessary used a water bath at  
292 100°C during 30 min. For DR and WC method the reaction between Benedict's reagent and sugar  
293 was necessary heat in water bath (90°C) during 5 min. The third pictogram is related to the amount  
294 of reagent used, health and safety risks. It should be emphasized that the residue generated in all  
295 methods were the solutions of Benedict's reagent, for the proposed methods, Fehling solutions A, B  
296 for AOAC one and samples. In addition, DR and WC methods low risk to the analyst was observed,  
297 since the analyzes are carried out in closed bottles, however in the AOAC method the titration of the  
298 samples must be carried out under boiling. The fourth pictogram is related to the volume and  
299 treatment waste and energy consumption, it is possible to see that the proposed method (DR and WC)  
300 generated about 78 times less waste volume than the AOAC method. In addition, the proposed method  
301 reduced energy expenditure by 5.5 times. And the fifth pictogram refers to the method, whether it is  
302 direct or indirect, and the three methods require sample preparation in advance, therefore they are  
303 indirect. The central circle indicates that the procedure is for qualification and quantification.

304 It is important to mention that the use of smartphone-based methods allowed the reduction of  
305 the volume of residue generated during analysis comparing to AOAC titration methods. Therefore, it

306 is possible to state that the use of smartphone methods reduced the residue generation in comparison  
307 to official one going into direction of green analytical chemistry principles. In addition, a high  
308 throughput was feasible since 400 and 250 samples per h<sup>-1</sup> could be read using DR and WC methods,  
309 respectively. Therefore, the proposed methods could be considered a suitable alternative to fulfill the  
310 green analytical chemistry principles in the determination of sugar in soft drink.

311

#### 312 **4. Conclusions**

313 In this study was proposed a colorimetric method for determination of reducing sugars in soft  
314 drink by USB camera coupled a smartphone device. The PLS regression was feasible for analysis of  
315 both DR and WC approaches with good agreement from (95.3 to 108.7%) with the AOAC one. A  
316 high throughput was reached, and up to 400 samples can be read in one hour. The greenness of the  
317 proposed smartphone-based methods can be highlighted with the reduction in energy expenditure by  
318 5.5 times and 78 times less waste volume than the AOAC method. Lastly, the safety features should  
319 be emphasized due to the reduction of the amount of reagents and the use of closed vessels for  
320 reaction.

321

#### 322 **References**

- 323 Al-Mhanna, N. M., Huebner, H., & Buchholz, R. (2018). Analysis of the Sugar Content in Food  
324 Products by Using Gas Chromatography Mass Spectrometry and Enzymatic Methods. *Foods*,  
325 7(11), 185. <https://doi.org/10.3390/foods7110185>
- 326 Başkan, K. S., Tütem, E., Akyüz, E., Özen, S., & Apak, R. (2016). Spectrophotometric total reducing  
327 sugars assay based on cupric reduction. *Talanta*, 147, 162–168.  
328 <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.09.049>
- 329 Baumann, L., Librelotto, M., Pappis, C., Santos, R. B. dos, Santos, R. O., Helfer, G. A., Lobo, E. A.,  
330 & Costa, A. B. da. (2019). Uso do aplicativo PhotoMetrix no monitoramento da concentração  
331 de flúor em sistemas alternativos de abastecimento de água. *Águas Subterrâneas*, 33(2).

- 332 <https://doi.org/10.14295/ras.v33i2.29539>
- 333 Ben da Costa, A., Pappis, C., Librelotto, M., Baumann, L., Parckert, A., Santos, R., Teixeira, I.,  
334 Helfer, G. A., & Lobo, E. A. (2019). Point-of-use determination of fluoride and phosphorus in  
335 water through a smartphone using the PhotoMetrix® app. *Brazilian Journal of Analytical*  
336 *Chemistry*, 6(25). <https://doi.org/10.30744/brjac.2179-3425.tn-25-2019>
- 337 Benedetti, L. P. dos S., Dos Santos, V. B., Silva, T. A., Filho, E. B., Martins, V. L., & Fatibello-Filho,  
338 O. (2015). A digital image-based method employing a spot-test for quantification of ethanol in  
339 drinks. *Analytical Methods*, 7(10), 4138–4144. <https://doi.org/10.1039/c5ay00529a>
- 340 Benedict, S. (1908). A REAGENT FOR THE DETECTION OF REDUCING SUGARS. *J. Biol.*  
341 *Chem.*, 5, 485–488.
- 342 Böck, F. C., Helfer, G. A., da Costa, A. B., Dessuy, M. B., & Ferrão, M. F. (2018). Rapid  
343 Determination of Ethanol in Sugarcane Spirit Using Partial Least Squares Regression Embedded  
344 in Smartphone. *Food Analytical Methods*, 11(7), 1951–1957. [https://doi.org/10.1007/s12161-](https://doi.org/10.1007/s12161-018-1167-4)  
345 [018-1167-4](https://doi.org/10.1007/s12161-018-1167-4)
- 346 BRASIL. (2005). Método 14 - Açúcares Redutores. *Manual de Métodos de Análises de Bebidas e*  
347 *Vinagres*, 1–5. [http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/metodos/arquivos-metodos-](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/metodos/arquivos-metodos-da-area-bev-iqa/nao-alcoolicos-14-acucares-redutores-nao-redutores-e-totais.pdf)  
348 [da-area-bev-iqa/nao-alcoolicos-14-acucares-redutores-nao-redutores-e-totais.pdf](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/metodos/arquivos-metodos-da-area-bev-iqa/nao-alcoolicos-14-acucares-redutores-nao-redutores-e-totais.pdf)
- 349 Choi, M.-H. H., Kim, G. H., Park, K. H., Kim, Y. S., & Shim, S. M. (2011). Bioaccessibility of Total  
350 Sugars in Carbonated Beverages and Fermented Milks. *Journal of the Korean Society for*  
351 *Applied Biological Chemistry*, 54(5), 778–782. <https://doi.org/10.3839/jksabc.2011.117>
- 352 Danchana, K., Phansi, P., T. de Souza, C., L.C. Ferreira, S., & Cerdà, V. (2020). Spectrophotometric  
353 system based on a device created by 3D printing for the accommodation of a webcam chamber  
354 as a detection system. *Talanta*, 206. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120250>
- 355 Dutta, S., Saikia, G. P., Sarma, D. J., Gupta, K., Das, P., & Nath, P. (2017). Protein, enzyme and  
356 carbohydrate quantification using smartphone through colorimetric digitization technique.  
357 *Journal of Biophotonics*, 10(5), 623–633. <https://doi.org/10.1002/jbio.201500329>

- 358 Ferreira, D. F., Tischer, B., Cichoski, A. J., Menezes, C. R., Wagner, R., Costa, A. B., & Barin, J. S.  
359 (2020). Thermal infrared enthalpimetry in paper microzone plates for green and high throughput  
360 determination of wine acidities. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 31(2), 421–428.  
361 <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190199>
- 362 Gałuszka, A., Migaszewski, Z., & Namieśnik, J. (2013). The 12 principles of green analytical  
363 chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *TrAC Trends in*  
364 *Analytical Chemistry*, 50, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.04.010>
- 365 Garrigues, S., Rambla, F. J., & De La Guardia, M. (1998). Comparative study of reflectance cells for  
366 PLS-FTIR determination of sugars in soft drinks. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*,  
367 362(1), 137–140. <https://doi.org/10.1007/s002160051046>
- 368 Gorbunova, M. O., Bayan, E. M., & Voitsikhovskaya, E. V. (2010). A gluco test for the quality control  
369 of food raw materials and products. *Journal of Analytical Chemistry*, 65(11), 1198–1202.  
370 <https://doi.org/10.1134/S1061934810110171>
- 371 Helfer, G. A., Tischer, B., Filoda, P. F., Parckert, A. B., dos Santos, R. B., Vinciguerra, L. L., Ferrão,  
372 M. F., Barin, J. S., & da Costa, A. Ben. (2018). A New Tool for Interpretation of Thermal  
373 Stability of Raw Milk by Means of the Alizarol Test Using a PLS Model on a Mobile Device.  
374 *Food Analytical Methods*, 11(7), 2022–2028. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1190-5>
- 375 Hong, J. Il, & Chang, B. Y. (2014). Development of the smartphone-based colorimetry for multi-  
376 analyte sensing arrays. *Lab on a Chip*, 14(10), 1725–1732. <https://doi.org/10.1039/c3lc51451j>
- 377 Horwitz, W. ;, & Latimer, G. W. (2019). *Official Methods of Analysis of the Association of Official*  
378 *Analytical Chemists* (21st ed.). AOAC International.
- 379 Hossain, M. M., Jahan, I., Shawan, M. M. A. K., Parvin, A., Hasan, M. M., Uddin, R. K., Akter, S.,  
380 Banik, S., Hasan, A. M., Morshed, M., Rahman, N. M., & Rahman, B. S. M. (2015).  
381 Determination of pH, caffeine and reducing sugar in energy drinks available in Bangladesh. In  
382 *New York Science Journal* (Vol. 8, Issue 2). [https://doi.org/ISSN: 1554-0200](https://doi.org/ISSN:1554-0200)
- 383 Hussain, I., Ahamad, K., & Nath, P. (2016). Water turbidity sensing using a smartphone. *RSC*

- 384 *Advances*, 6(27), 22374–22382. <https://doi.org/10.1039/c6ra02483a>
- 385 Instituto Adolfo Lutz. (2008). *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos*  
386 *para análises de alimentos*. 4<sup>a</sup> Ed. (1<sup>a</sup> Edição Digital).  
387 [http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016\\_3\\_19/analisedealimentosial\\_2008.pdf](http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016_3_19/analisedealimentosial_2008.pdf)  
388 f
- 389 Kim, S. D., Koo, Y., & Yun, Y. (2017). A smartphone-based automatic measurement method for  
390 colorimetric pH detection using a color adaptation algorithm. *Sensors (Switzerland)*, 17(7).  
391 <https://doi.org/10.3390/s17071604>
- 392 Komes, D., Bel, A., Horži, D., & Babahmetovi, L. (2011). Application of different methods for  
393 carbohydrates determination in raw materials and confectionery products enriched with dietary  
394 fibres. *Proceedings of the 11th International Congress on Engineering and Food*, 1–6.
- 395 Lane, H., & Eynon, L. (1923). Determination of reducing sugar by means of Fehling's solution with  
396 methylene blue as internal indicator. *J. Soc. Chem. Ind.*, 17, 32–37.
- 397 Lopez-Ruiz, N., Curto, V. F., Erenas, M. M., Benito-Lopez, F., Diamond, D., Palma, A. J., & Capitan-  
398 Vallvey, L. F. (2014). Smartphone-based simultaneous pH and nitrite colorimetric determination  
399 for paper microfluidic devices. *Analytical Chemistry*, 86(19), 9554–9562.  
400 <https://doi.org/10.1021/ac5019205>
- 401 Magnusson, B., & Örnemark, U. (2014). *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical*  
402 *Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics* (2nd ed.).
- 403 Marrubini, G., Papetti, A., Genorini, E., & Ulrici, A. (2017). Determination of the Sugar Content in  
404 Commercial Plant Milks by Near Infrared Spectroscopy and Luff-Schoorl Total Glucose  
405 Titration. *Food Analytical Methods*, 10(5), 1556–1567. [https://doi.org/10.1007/s12161-016-](https://doi.org/10.1007/s12161-016-0713-1)  
406 0713-1
- 407 Martinez, A. W., Phillips, S. T., Carrilho, E., Thomas, S. W., Sindi, H., & Whitesides, G. M. (2008).  
408 Simple telemedicine for developing regions: Camera phones and paper-based microfluidic  
409 devices for real-time, off-site diagnosis. *Analytical Chemistry*, 80(10), 3699–3707.

- 410 <https://doi.org/10.1021/ac800112r>
- 411 Oliveira, A. S., Ballus, C. A., Menezes, C. R., Wagner, R., Paniz, J. N. G., Tischer, B., Costa, A. B.,  
412 & Barin, J. S. (2018). Green and fast determination of the alcoholic content of wines using  
413 thermal infrared enthalpimetry. *Food Chemistry*, 258(March), 59–62.  
414 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.028>
- 415 Oliveira, A. S., Nora, F. M. D., Mello, R. O., Mello, P. A., Tischer, B., Costa, A. B., & Barin, J. S.  
416 (2017). One-Shot, reagent-free determination of the alcoholic content of distilled beverages by  
417 thermal infrared enthalpimetry. *Talanta*, 171(May), 335–340.  
418 <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.05.011>
- 419 Park, T. S., & Yoon, J. Y. (2015). Smartphone detection of Escherichia coli from field water samples  
420 on paper microfluidics. *IEEE Sensors Journal*, 15(3), 1902–1907.  
421 <https://doi.org/10.1109/JSEN.2014.2367039>
- 422 Plotka-Wasyłka, J. (2018). A new tool for the evaluation of the analytical procedure: Green Analytical  
423 Procedure Index. *Talanta*, 181, 204–209. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.01.013>
- 424 Ramasami, P., Jhaumeer-Laulloo, S., Rondeau, P., Cadet, F., Seepujak, H., & Seeruttun, A. (2004).  
425 Quantification of sugars in soft drinks and fruit juices by density, refractometry, infrared  
426 spectroscopy and statistical methods. *South African Journal of Chemistry*, 57, 24–27.  
427 <https://www.researchgate.net/publication/258844657>
- 428 Rech, A. M., Weiler, F. H., & Ferrão, M. F. (2018). Determination of Total Sugar Content in Soy-  
429 Based Drinks Using Infrared Spectroscopy and Chemometrics. *Food Analytical Methods*, 11(7),  
430 1986–1993. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1170-9>
- 431 Shao, Y., & Lin, A. H. M. (2018). Improvement in the quantification of reducing sugars by  
432 miniaturizing the Somogyi-Nelson assay using a microtiter plate. *Food Chemistry*, 240, 898–  
433 903. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.083>
- 434 Silva, R. do N., Monteiro, V. N., Alcanfor, J. D. X., Assis, E. M., Asquieri, E. R., Do, R., Silva, N.,  
435 Monteiro, V. N., D'arc, J., Alcanfor, X., Assis, E. M., & Asquieri, E. R. (2006). Comparação de

- 436 métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. *Ciência e Tecnologia de*  
437 *Alimentos*, 23(3), 337–341. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612003000300007>
- 438 Solmaz, M. E., Mutlu, A. Y., Alankus, G., Kılıç, V., Bayram, A., & Horzum, N. (2018). Quantifying  
439 colorimetric tests using a smartphone app based on machine learning classifiers. *Sensors and*  
440 *Actuators, B: Chemical*, 255, 1967–1973. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.08.220>
- 441 Spencer, G. L., & Meade, G. P. (1945). *Special Reagentes. Cane Sugar Handbook*. Wiley.
- 442 Taufik, I. I., & Guntarti, A. (2009). Comparison of reduction sugar analysis method in cilembu sweet  
443 potato (*Ipomoea batatas* L.) using luff schoorl and anthrone method. *Jurnal Kedokteran Dan*  
444 *Kesehatan Indonesia*, 7(5), 219–226. <https://doi.org/10.20885/jkki.vol7.iss5.art8>
- 445 Tischer, B., Oliveira, A. S., Costa, A. B., Cichoski, A. J., Barcia, M. T., Wagner, R., & Barin, J. S.  
446 (2017). Rapid and simultaneous determination of acidity and salt content of pickled vegetable  
447 brine by using thermal infrared enthalpimetry. *Journal of Food Composition and Analysis*,  
448 63(Supplement C), 34–37. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.07.029>
- 449 Voss, M., Schlessner, S. K., Ferreira, D., Oliveira, A. S., Deprá, M. C., Jacob-Lopes, E., & Barin, J.  
450 S. (2019). Feasibility of paper microzone plates for greener determination of the alcoholic  
451 content of beverages by thermal infrared enthalpimetry. *Analytical Methods*, 11(39), 4983–4990.  
452 <https://doi.org/10.1039/c9ay01587f>
- 453 Xia, M. L., Wang, L., Yang, Z. X., & Chen, H. Z. (2015). A novel digital color analysis method for  
454 rapid glucose detection. *Analytical Methods*, 7(16), 6654–6663.  
455 <https://doi.org/10.1039/c5ay01233c>
- 456
- 457
- 458
- 459
- 460
- 461

462 **Table 1** PLS regression results for smartphone-based determination of sugar in soft drinks using  
 463

Parameter	DR	WC
Samples calibration	20 to 24	19 to 24
Samples prediction	15	15
Number of factors	3 - 5	5
Slope	0.9900 - 0.9979	0.9943 - 0.9990
Offset	0.0031 - 0.0095	0.0025 - 0.0071
R <sup>2</sup> <sub>Cal</sub>	0.990 - 0.997	0.994 - 0.998
RMSEC (mg mL <sup>-1</sup> )	0.05 - 0.07	0.03 - 0.05
RMSECV (mg mL <sup>-1</sup> )	0.15 - 0.23	0.09 - 0.23
Bias (mg mL <sup>-1</sup> )	0.005 -0.104	0.011 - 0.135
RMSEP (mg mL <sup>-1</sup> )	0.03 - 0.12	0.02 - 0.13

RMSEC - Root mean square error of calibration  
 RMSECV - Root Mean Square Error in cross-validation  
 RMSEP - Root mean square error of prediction

464

465

466

467

468

469

470

471

472

473

474

475 **Figure captions**

476 **Figure 1.** Procedures used for determination of sugar content of soft drinks.

477

478 **Figure 2.** Correlation between sugar content measured with DR (A) and WC (B) for known  
479 concentrations predicted using the proposed smartphone-based method.

480

481 **Figure 3.** Results (mean  $\pm$  standard deviation) for the determination of sugar in soft drink (C = cola;  
482 G = guarana; L= lemon; O= orange and T = tonic water, w/v) using the proposed smartphone-based  
483 DR and WC (n=15) and AOAC (n=3) methods.

484

485 **Figure 4.** Green analytical procedure index (GAPI) evaluation of the AOAC (923.09), Smartphone-  
486 based DR and WC for the determination of the sugar in soft drink. The colors green, yellow and red  
487 symbolize the characteristics of good, regular and not good conformity to green analytical chemistry.  
488 White color was used when not applicable. 1. Sample collection, preservation, transport and storage;  
489 2. Sample preparation; 3. Reagents and compounds; 4. Instrumentation; 5. Method type.

490

491

492

493

494

495

496

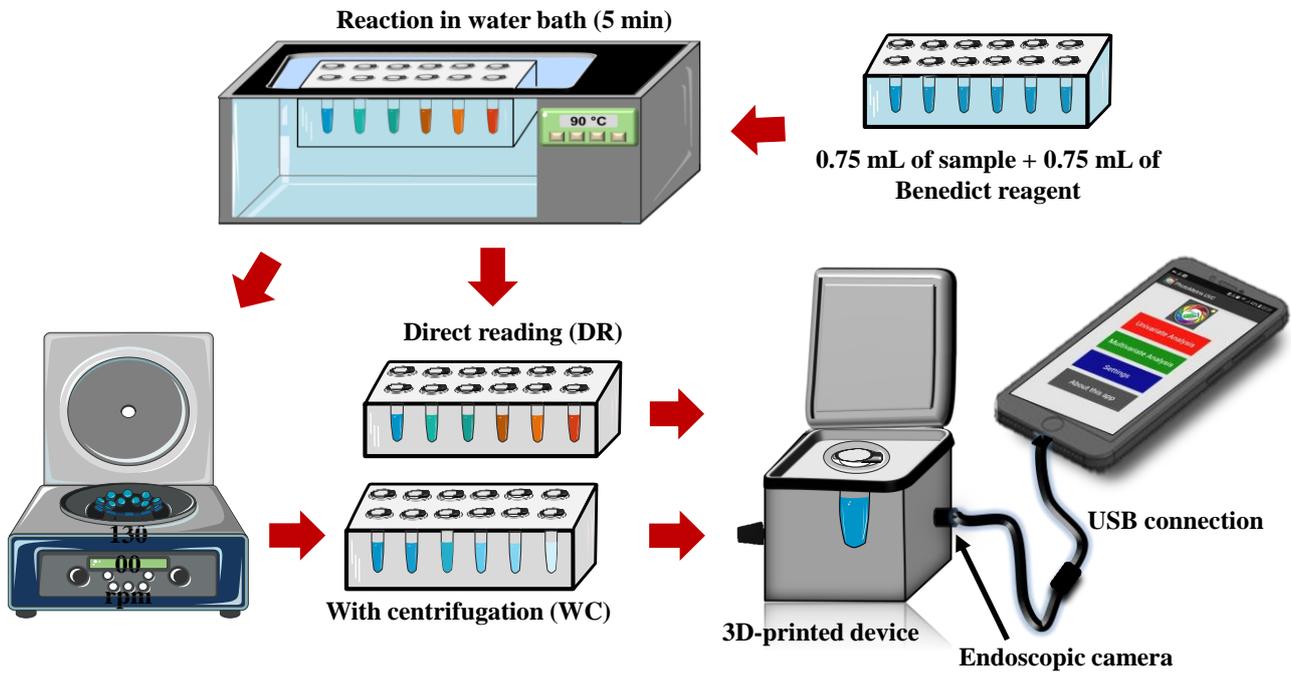
497

498

499

500

501 **Figure 1.**



502

503

504

505

506

507

508

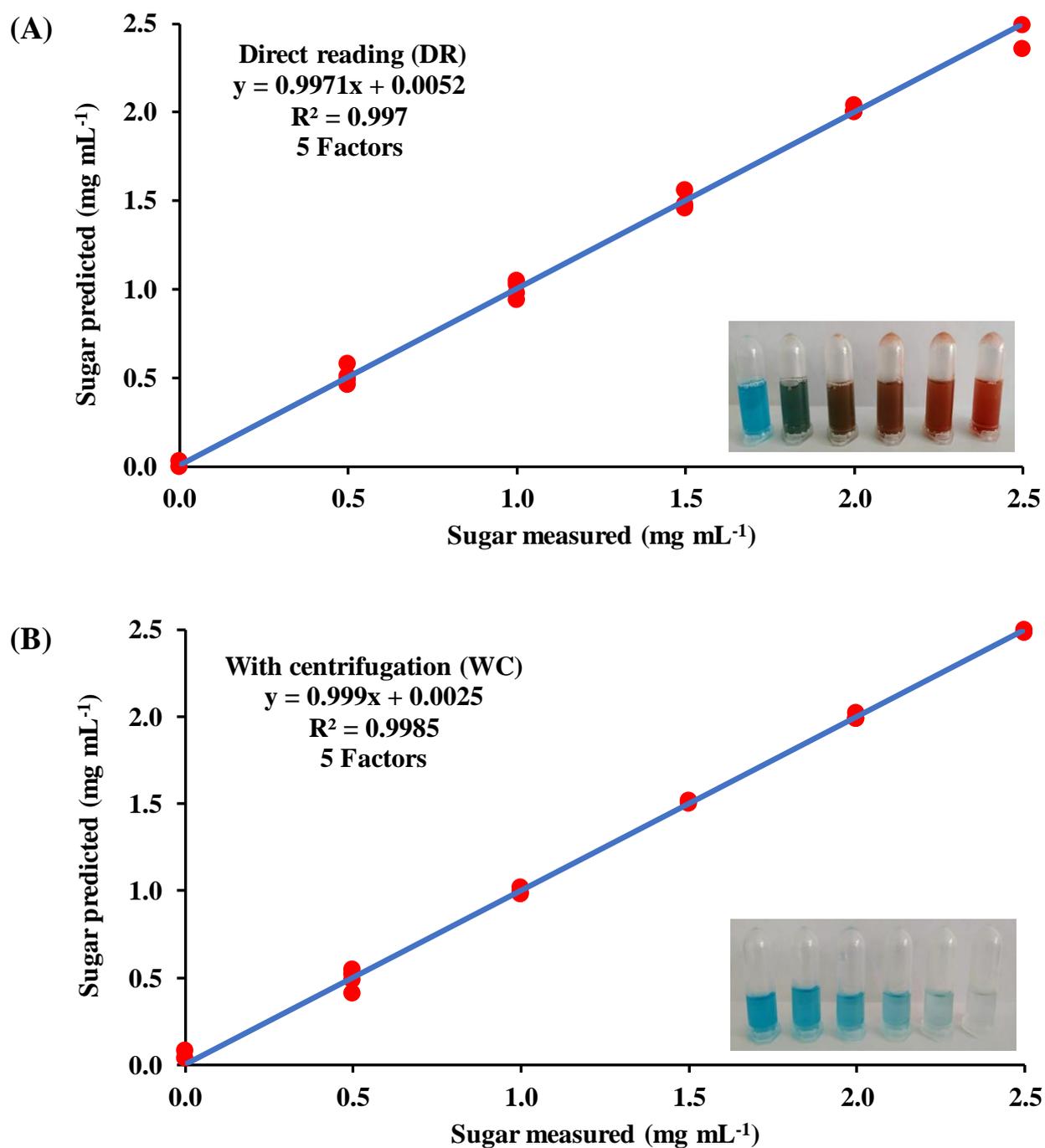
509

510

511

512

513 Figure 2.



514

515

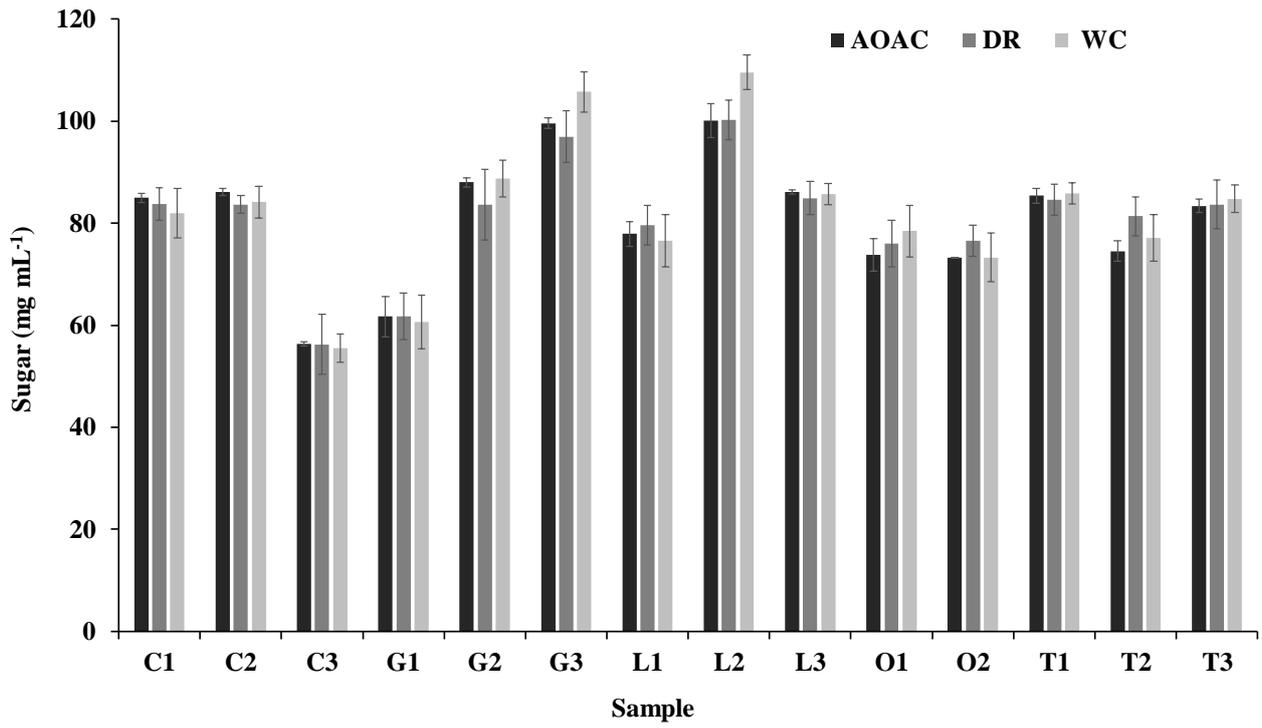
516

517

518

519

520 Figure 3.



521

522

523

524

525

526

527

528

529

530

531

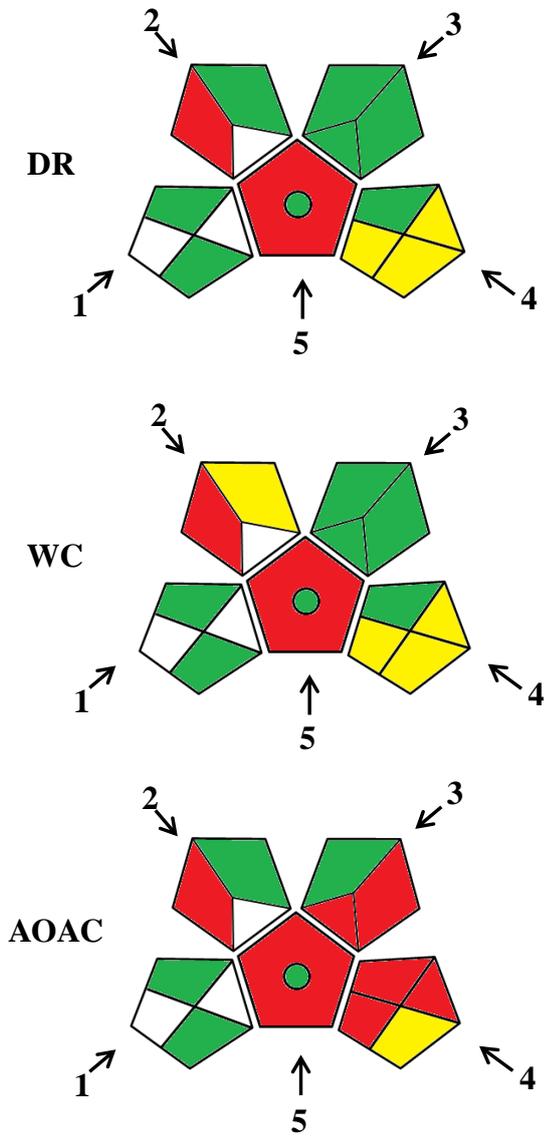
532

533

534

535 **Figure 4.**

536



537

538

539

540

541

542

543

544

545 **Supplementary material – Table S1.** Experimental design for smartphone-based determination of  
 546 reducing sugars in soft drinks.

Independent variables	Units	Variables				
		- $\infty$	- 1	+ 0	+ 1	+ $\infty$
Lighting $x_1$	lux	2	5	12	35	74
Volume $x_2$	mL	0.396	0.500	0.750	1.000	1.104

547

548

549

550 **Supplementary material – Table S2.** Green analytical procedure index (GAPI) parameters for  
 551 analytical procedures used for sugar determination in soft drinks.

552

Category	DR	WC	AOAC
<b>Sample preparation</b>			
Collection	-	-	-
Preservation	Unnecessary	Unnecessary	Unnecessary
Transport	-	-	-
Storage	Store the sample at room temperature and without light	Store the sample at room temperature and without light	Store the sample at room temperature and without light
Type of method: direct or indirect	Requires reaction in bath water during 30 min, between Benedict reagent and sample	Requires reaction in bath water during 30 min, between Benedict reagent and sample	Requires reaction in bath water during 30 min, between Fehling A, B reagent and sample
Scale of sample preparation	-	-	-
Solvents/reagents used	Benedict's reagent (contain copper)	Benedict's reagent (contain copper)	Fehling reagent (contain copper)
Additional treatments	None	Centrifugation and collection of the supernatant	None
<b>Reagent and solvents</b>			
Amount	0.010 mL of NaOH	0.010 mL of NaOH	0.6 mL of NaOH
	0.014 mL of HCl	0.014 mL of HCl	1.0 mL of HCl
	0.010 mL lead acetate	0.010 mL lead acetate	1.5 mL lead acetate
	1 mL of Benedict's reagent	1 mL of Benedict's reagent	5 mL of Fehling A
	0.75 mL of diluted sample (80 times)	0.75 mL of diluted sample (80 times)	5 mL of Fehling B
Health hazard	No special hazards	No special hazards	121.9 mL of water
Safety hazard	Low flammability or instability	Low flammability or instability	5 mL of sample
<b>Instrumentation</b>			
Energy	0.4619 KWh	0.4623 KWh	No special hazards
Occupational hazard	Hermetic sealing of analytical process	Hermetic sealing of analytical process	Low flammability or instability, but requires boiling titration
Waste	1.784 mL	1.784 mL	
Waste treatment	Require passivation	Require passivation	
<b>Quantification</b>	Yes	Yes	Yes

553

554 **Supplementary material – Table S3.** Experimental conditions and instrumental responses of the  
 555 rotational central composite design (CCD) used to optimize the parameter of color intensity (RGB)  
 556 for smartphone-based determination of reducing sugars in soft drinks.

Run	Lighting ( $x_1$ , lux)		Volume ( $x_2$ , mL)		R ( $Y_1$ )	G ( $Y_2$ )	B ( $Y_3$ )
E-1	-1	5	-1	0.500	125	147	178
E-2	1	35	-1	0.500	153	182	214
E-3	-1	5	1	1.000	116	163	190
E-4	1	35	1	1.000	149	200	207
E-5	- $\alpha$	2	0	0.750	54	78	98
E-6	+ $\alpha$	74.30	0	0.750	169	207	237
E-7	0	13.50	- $\alpha$	0.396	144	170	199
E-8	0	13.50	+ $\alpha$	1.104	127	177	205
E-9	0	13.50	0	0.750	143	179	206
E-10	0	13.50	0	0.750	138	175	202
E-11	0	13.50	0	0.750	141	179	205
E-12	0	13.50	0	0.750	142	178	204

557

558

559

560

561

562

563

564

565

566

567 **Supplementary material – Table S4.** Analysis of variance (ANOVA) of the intensity of color (RGB)  
 568 for smartphone-based determination of reducing sugars in soft drinks.

Source	SS	Df	MS	F calc	<i>p</i> value
<b>Red</b>					
Regression	6247	1	6247	23.2	0.00070
Residual	2687	10	269		
Lack-of-fit	2676	7	382	104	0.00141
Pure Error	11.0	3	3.7		
Total	8934	11			
R squared = 0.70					
<b>Green</b>					
Regression	8090	7	80890	21.8	0.00088
Residual	3703	10	370		
Lack-of-fit	3693	7	528	169	0.00069
Pure Error	9.4	3	3.1		
Total	11793	11			
R squared = 0.69					
<b>Blue</b>					
Regression	7740	1	7740	16.7	0.00022
Residual	4628	10	463		
Lack-of-fit	4622	7	660	308	0.00028
Pure Error	6.4	3	2.1		
Total	12369	11			
R squared = 0.63					

569

570

571

572

573

574

575

576

577 **Supplementary material – Table S5.** Results obtained for RGB values after generation of  
578 mathematical model for significant parameters for experimental conditions.

Parameters	p-value R	p-value G	p-value B
Lighting ( $x_1$ )	0.0029	0.0030	0.0069
Volume ( $x_2$ )	0.4589	0.4377	0.8480
Interaction ( $x_1 - x_2$ )	0.8885	0.9551	0.6785

579

580

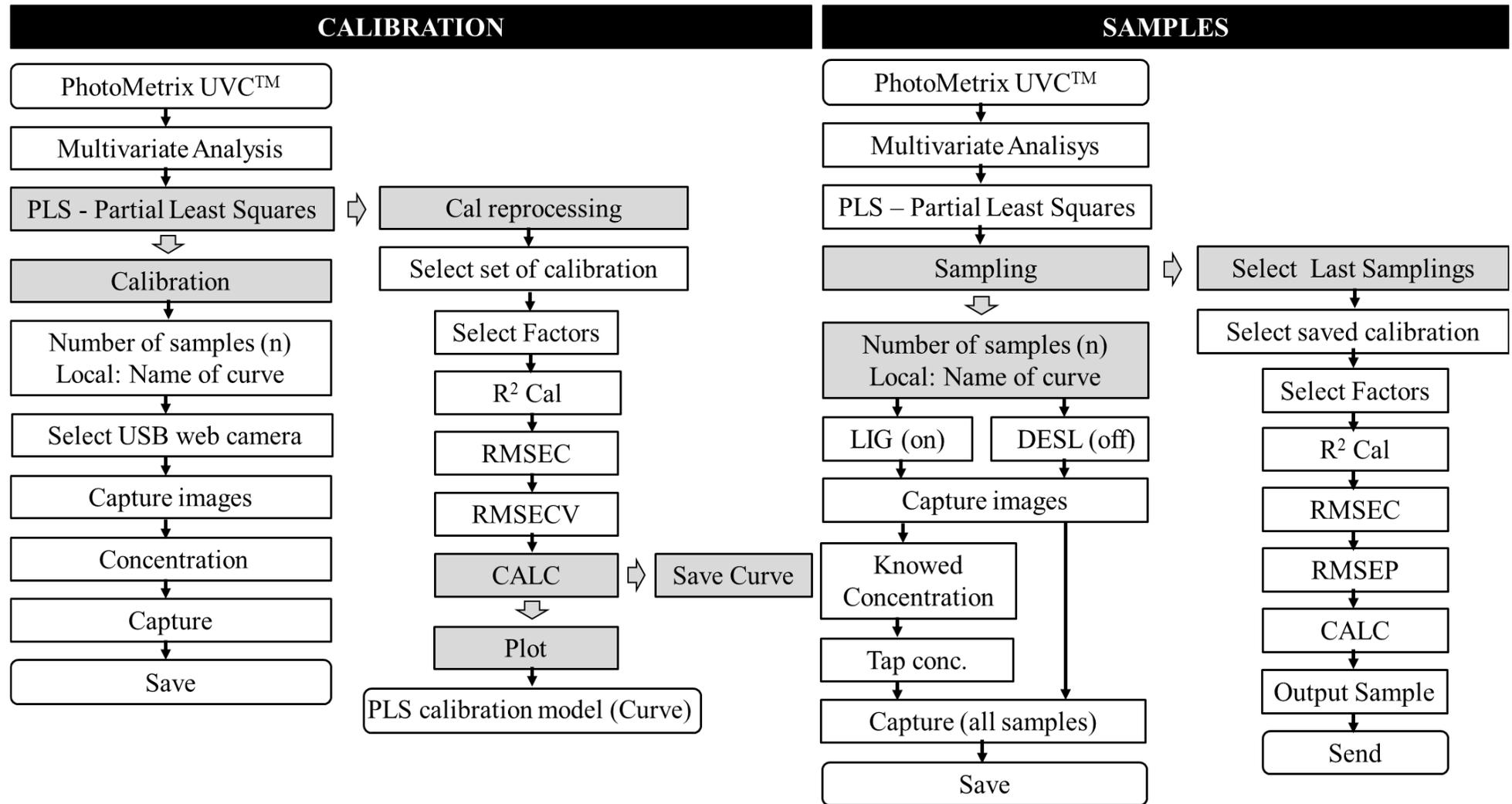
581 **Supplementary material – Table S6.** Results (mean  $\pm$  standard deviation) for the determination of  
 582 sugar in soft drink (C = cola; G = guarana; L= lemon; O= orange and T = tonic water, % w/v) using  
 583 the proposed smartphone-based DR and WC (n=15) and AOAC (n=3) methods.

Samples	Smartphone-based methods		AOAC
	DR	WC	
C1	8.38 $\pm$ 0.27	8.20 $\pm$ 0.40	8.5 $\pm$ 0.08
C2	8.37 $\pm$ 0.15	8.41 $\pm$ 0.27	8.61 $\pm$ 0.06
C3	5.62 $\pm$ 0.33	5.55 $\pm$ 0.15	5.63 $\pm$ 0.02
G1	6.17 $\pm$ 0.28	6.06 $\pm$ 0.32	6.17 $\pm$ 0.24
G2	8.36 $\pm$ 0.58	8.87 $\pm$ 0.32	8.8 $\pm$ 0.08
G3	9.70 $\pm$ 0.50	10.58 $\pm$ 0.42	9.96 $\pm$ 0.11
L1	7.96 $\pm$ 0.31	7.65 $\pm$ 0.39	7.79 $\pm$ 0.04
L2	10.02 $\pm$ 0.39	10.96 $\pm$ 0.38	10.01 $\pm$ 0.33
L3	8.49 $\pm$ 0.28	8.57 $\pm$ 0.17	8.61 $\pm$ 0.04
O1	7.60 $\pm$ 0.35	7.85 $\pm$ 0.40	7.38 $\pm$ 0.23
O1	7.66 $\pm$ 0.23	7.33 $\pm$ 0.35	7.33 $\pm$ 0.20
T1	8.46 $\pm$ 0.26	8.59 $\pm$ 0.18	8.54 $\pm$ 0.12
T2	8.14 $\pm$ 0.31	7.71 $\pm$ 0.35	7.45 $\pm$ 0.15
T3	8.37 $\pm$ 0.40	8.48 $\pm$ 0.23	8.34 $\pm$ 0.11

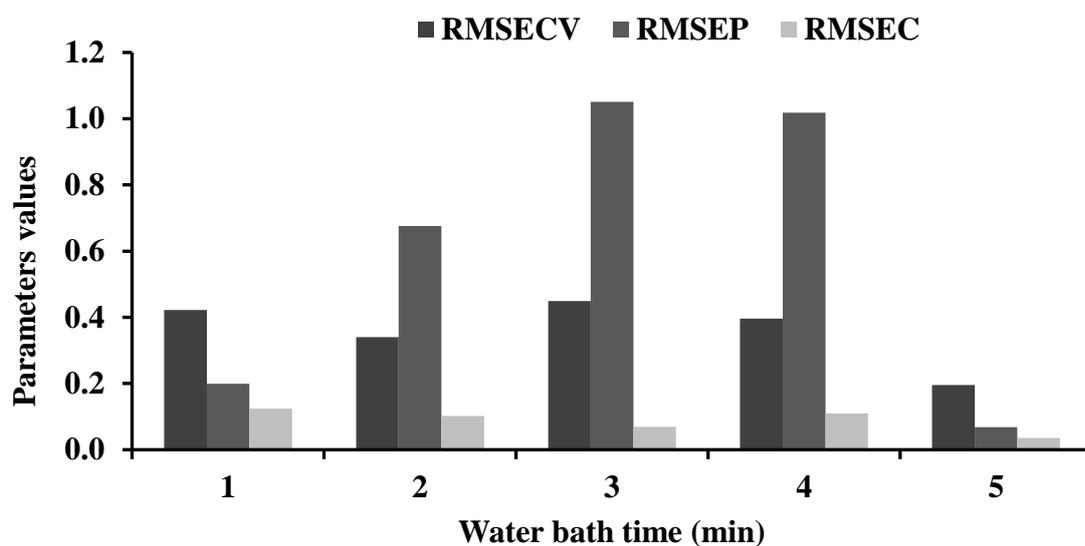
584

585

586 **Supplementary material – Figure S1.** Steps for both calibration and determination of sugar in soft drinks samples using the Photometrix UVC app in  
 587 the smartphone.



589 **Supplementary material – Figure S2.** Results for the evaluation of the time of reaction in a  
590 water bath using the DR method. Total volume of 2 mL: 1 mL of Benedict's reagent solution  
591 and 1 mL of hydrolyzed sucrose solutions in concentrations ranging from 0.5 to 2.5 mg mL<sup>-1</sup>.



592

593

594

595

596

597

598

599

600

601

602

## 5 CONCLUSÃO

O estudo permitiu o desenvolvimento de um novo método analítico para a análise de açúcares usando um aplicativo para *smartphone*. O ensaio foi aplicado em refrigerantes, no entanto, pode ser expandido para uma ampla variedade de amostras. As análises realizadas pelo método convencional e com o aplicativo PhotoMetrix apresentaram valores concordantes. A eficiência desta nova ferramenta de análise para a determinação de açúcares totais destaca seu potencial para análises rápidas e acessíveis. Além disso, representa um método valioso para análise de campo e para uso em escala industrial e em ambiente escolar. O método desenvolvido também apresentou vantagens quando comparado ao método convencional, pois reduz o tempo de análise, permite maior mobilidade e oferece um aumento significativo na frequência analítica. Neste contexto, o uso deste aplicativo associado à popularização dos *smartphones* torna o emprego desta ferramenta uma possibilidade para análises químicas rápidas e de baixo custo, com redução significativa do uso de reagentes e geração de resíduos químicos, indo ao encontro dos princípios da química analítica verde.

## REFERÊNCIAS

- ACEVEDO, Maria Soledad M. S. F. *et al.* A green and cost-effective procedure for determination of anionic surfactants in milk with liquid-liquid microextraction and smartphone-based photometric detection. **Microchemical Journal**, [S. l.], v. 143, p. 259–263, 2018.
- AL-MHANNA, Najah M.; HUEBNER, Holger; BUCHHOLZ, Rainer. Analysis of the Sugar Content in Food Products by Using Gas Chromatography Mass Spectrometry and Enzymatic Methods. **Foods**, [S. l.], v. 7, n. 11, p. 185, 2018.
- ALOH, G. S. ... *et al.* Estimation of sugar in soft drinks. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 4, n. 03, p. 112–125, 2015. Disponível em: [www.wjpps.com](http://www.wjpps.com)
- ALVES, Rogério Marcos de Oliveira *et al.* Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona mandacaia* SMITH (Hymenoptera: Apidae). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 644–650, 2005.
- ANDJELKOVIĆ, Uroš; PIĆURIĆ, Srdjan; VUJČIĆ, Zoran. Purification and characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase isoforms. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 120, n. 3, p. 799–804, 2010.
- ANDRADE, Stéfani Iury E. *et al.* A digital image-based flow-batch analyzer for determining Al(III) and Cr(VI) in water. **Microchemical Journal**, [S. l.], v. 109, p. 106–111, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X12000884?via%3Dihub>. Acesso em: 27 fev. 2020.
- ARAÚJO, Alberto N. *et al.* Sequential injection system for the spectrophotometric determination of reducing sugars in wines. **Talanta**, [S. l.], v. 52, n. 1, p. 59–66, 2000. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0039914099003380>. Acesso em: 22 fev. 2020.
- ASHURST, Philip R. **Chemistry and Technology of Soft Drinks and Fruit Juices**. 3. ed. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Ltd., 2016.
- ASKIM, Jon R.; MAHMOUDI, Morteza; SUSLICK, Kenneth S. Optical sensor arrays for chemical sensing: The optoelectronic nose. **Chemical Society Reviews**, [S. l.], v. 42, n. 22, p. 8649–8682, 2013.
- BAŞKAN, Kevser Sözgen *et al.* Spectrophotometric total reducing sugars assay based on cupric reduction. **Talanta**, [S. l.], v. 147, p. 162–168, 2016.
- BAUMANN, Luiza *et al.* Uso do aplicativo PhotoMetrix no monitoramento da concentração de flúor em sistemas alternativos de abastecimento de água. **Águas Subterrâneas**, [S. l.], v. 33, n. 2, 2019.
- BEN DA COSTA, Adilson *et al.* Point-of-use determination of fluoride and phosphorus in water through a smartphone using the PhotoMetrix® app. **Brazilian Journal of Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 6, n. 25, 2019.

BENEDETTI, Luzia Pires dos Santos *et al.* A digital image-based method employing a spot-test for quantification of ethanol in drinks. **Analytical Methods**, [S. l.], v. 7, n. 10, p. 4138–4144, 2015.

BENEDICT, S. R. A reagent for the detection of reducing sugars. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 277, n. 16, 1908. Disponível em: <http://www.jbc.org/>

BENEDICT, Stanley. The detection and estimation of glucose in urine. **Journal of the American Medical Association**, [S. l.], v. LVII, n. 15, p. 1193–1194, 1911.

BERGMEYER, H. U.; BERNT, E. Determination of glucose with glucose oxidase and peroxidase. In: **Methods of Enzymatic Analysis**, ed. H.U. Berg-meyer. Weinheim-London: Verlag Chemie-Academic Press, 1974. p. 1205–1215.

BOAHEN, Yaw Opoku; ISAAC, Antwi. Colorimetric determination of carbohydrates in some brands of beer in Ghana as an indication of their glycemic index in the management of diabetes type II. **African Journal of Food Science and Technology**, [S. l.], v. 6, n. 7, p. 2141–5455, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14303/ajfst.2015.066>

BÖCK, Fernanda C. *et al.* Rapid Determination of Ethanol in Sugarcane Spirit Using Partial Least Squares Regression Embedded in Smartphone. **Food Analytical Methods**, [S. l.], v. 11, n. 7, p. 1951–1957, 2018.

BRASIL. **DECRETO Nº 6.871, DE 4 DE JUNHO DE 2009**. Brasil, 2009. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6871.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6871.htm). Acesso em: 26 fev. 2020.

BRASIL, Ministério da Agricultura. **Portaria nº 76 de 26 de novembro de 1986. Dispõe sobre os métodos analíticos de bebidas e vinagre**. Brasília, Brasil [s. n.]. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/metodos/arquivos-metodos-da-area-bev-iqa/nao-alcoolicos-14-acucares-redutores-nao-redutores-e-totais.pdf>. Acesso em: 14 fev. 2020.

BRUICE, Paula Yurkanis. **Química Orgânica: Volume 2**. 4. ed. São Paulo, SP, Brasil: Pearson Universidades, 2005.

CALDAS, Bárbara Sthéfani *et al.* Determinação de açúcares em suco concentrado e néctar de uva: comparativo empregando refratometria, espectrofotometria e cromatografia líquida. **Scientia Chromatographica**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 53–63, 2015.

CAMPOS, Antonio R. *et al.* Quantifying Gold Nanoparticle Concentration in a Dietary Supplement Using Smartphone Colorimetry and Google Applications. **Journal of Chemical Education**, [S. l.], v. 93, n. 2, p. 318–321, 2016.

CAPUANO, Edoardo; VAN RUTH, Saskia M. QA: Fraud Control for Foods and Other Biomaterials by Product Fingerprinting. In: **Latest Research into Quality Control**. [S. l.: s. n.]. p. 111–143.

CAVAGIS, Alexandre D. M.; PEREIRA, Elisabete Alves; OLIVEIRA, Luciana Camargo de. A simple method to evaluate the amount of sucrose and CO<sub>2</sub> in soft drinks. **Química Nova na Escola**, [S. l.], v. 36, n. 3, 2014.

CAYUELA, J. A.; WEILAND, Carlos. Intact orange quality prediction with two portable NIR

spectrometers. **Postharvest biology and technology**, [S. l.], v. v. 58, n. 2, p. 113-120–2010 v.58 n°2, 2010.

CHOI, Jane Ru *et al.* An integrated lateral flow assay for effective DNA amplification and detection at the point of care. **Analyst**, [S. l.], v. 141, n. 10, p. 2930–2939, 2016.

CHOI, Mi-Hee Hee *et al.* Bioaccessibility of Total Sugars in Carbonated Beverages and Fermented Milks. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, [S. l.], v. 54, n. 5, p. 778–782, 2011.

CHOW, Pak S.; LANDHÄUSSER, Simon M. A method for routine measurements of total sugar and starch content in woody plant tissues. **Tree physiology**, [S. l.], v. 24, n. 10, p. 1129–1136, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15294759>

CORREIA, Paulo R. M.; FERREIRA, Márcia M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: Explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**, [S. l.], v. 30, n. 2, p. 481–487, 2007. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422007000200042&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000200042&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt). Acesso em: 30 mar. 2020.

COSTA, Vinícius; NEIVA, Ariane; PEREIRA-FILHO, Edenir. Chromium speciation in leather samples: An experiment using digital images, mobile phones and environmental concepts. **Eletica Química**, [S. l.], v. 44, p. 62–74, 2019.

DA SILVA LYRA, Wellington *et al.* Determination of sodium and calcium in powder milk using digital image-based flame emission spectrometry. **Analytical Methods**, [S. l.], v. 6, n. 4, p. 1044–1050, 2014.

DAMASCENO, Deangelis *et al.* Análise multivariada de imagens na química: Um experimento para determinação do pH de águas potáveis. **Química Nova**, [S. l.], v. 38, n. 6, p. 836–841, 2015.

DANCHANA, Kaewta *et al.* Spectrophotometric system based on a device created by 3D printing for the accommodation of a webcam chamber as a detection system. **Talanta**, [S. l.], v. 206, 2020.

DAVIS, G. R. F. Yagoda papers: A permanent record of Benedict's test for reducing sugars. **Clinica Chimica Acta**, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 635–636, 1963.

DE SOUZA, João Carlos *et al.* Electroactive sugars, organic acids and sugar alcohol analysis in wine using anion-exchange chromatography with electrochemical detection. **Microchemical Journal**, [S. l.], v. 147, p. 972–978, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X18314875>. Acesso em: 26 fev. 2020.

DELLA PELLE, Flavio *et al.* Silver nanoparticles-based plasmonic assay for the determination of sugar content in food matrices. **Analytica Chimica Acta**, [S. l.], v. 1051, p. 129–137, 2019.

DEMIATE, Ivo Mottin *et al.* Determinação de açúcares redutores e totais em alimentos: comparação entre método colorimétrico e titulométrico. **Publicatio UEPG - Ciências Exatas e da Terra, Agrarias e Engenharias**, [S. l.], v. 8, n. 01, p. 65–78, 2002.

DOS SANTOS, Angela Alves *et al.* Dosagem de açúcares redutores com o reativo DNS em microplaca. **Brazilian Journal of Food Technology**, [S. l.], v. 20, 2017.

DOS SANTOS, Vagner Bezerra *et al.* Low cost in situ digital image method, based on spot testing and smartphone images, for determination of ascorbic acid in Brazilian Amazon native and exotic fruits. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 285, p. 340–346, 2019.

DUBOIS, Michel *et al.* Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956. Disponível em: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>

DURMAZEL, Selen *et al.* Silver Nanoparticle Formation-Based Colorimetric Determination of Reducing Sugars in Food Extracts via Tollens' Reagent. **ACS Omega**, [S. l.], v. 4, n. 4, p. 7596–7604, 2019.

DUTTA, Sibasish *et al.* Protein, enzyme and carbohydrate quantification using smartphone through colorimetric digitization technique. **Journal of Biophotonics**, [S. l.], v. 10, n. 5, p. 623–633, 2017.

FARAG, Souly. Separation and analysis of some sugars by using thin layer chromatography. **Journal of Sugarbeet Research**, [S. l.], v. 20, n. 3, p. 251–254, 1979.

FERRÃO, Marco Flôres *et al.* Determinação simultânea dos teores de cinza e proteína em farinha de trigo empregando NIR-PLS e DRIFT-PLS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [S. l.], v. 24, n. 3, p. 333–340, 2004.

FLEISCHER, Holger. Die „Iod-Probe“ als Alternative zur Fehling- und Benedict-Probe - Eine einfache und gefahrungsfreie Nachweisreaktion auf reduzierende Zucker. **Chemkon**, [S. l.], v. 24, n. 3, p. 119–123, 2017.

GAIÃO, Edvaldo da Nobrega *et al.* Digital image-based titrations. **Analytica Chimica Acta**, [S. l.], v. 570, n. 2, p. 283–290, 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267006008634?via%3Dihub>. Acesso em: 27 fev. 2020.

GARRIGA, Marisa; ALMARAZ, Melisa; MARCHIARO, Alicia. Determination of reducing sugars in extracts of *Undaria pinnatifida* (harvey) algae by UV-visible spectrophotometry (DNS method). **Actas de Ingeniería**, [S. l.], v. 3, p. 173–179, 2017. Disponível em: <http://fundacioniai.org/actas>

GEE, Clifford T. *et al.* Quantifying Protein Concentrations Using Smartphone Colorimetry: A New Method for an Established Test. **Journal of Chemical Education**, [S. l.], v. 94, n. 7, p. 941–945, 2017.

GODINHO, Mariana S. *et al.* Evaluation of transformer insulating oil quality using NIR, fluorescence, and NMR spectroscopic data fusion. **Talanta**, [S. l.], v. 129, p. 143–149, 2014.

GODWILL, Engwa Azeh *et al.* Determination of some soft drink constituents and contamination by some heavy metals in Nigeria. **Toxicology Reports**, [S. l.], v. 2, p. 384–390, 2015.

GOMES, Marcos S. *et al.* Uso de scanner em espectrofotometria de absorção molecular:

Aplicação em experimento didático enfocando a determinação de ácido ascórbico. **Química Nova**, [S. l.], v. 31, n. 6, p. 1577–1581, 2008.

GONÇALVES, Cristiana *et al.* Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates. **Analytical Methods**, [S. l.], v. 2, n. 12, p. 2046–2048, 2010.

GORBUNOVA, M. O.; BAYAN, E. M.; VOITSIKHOVSKAYA, E. V. A glucotest for the quality control of food raw materials and products. **Journal of Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 65, n. 11, p. 1198–1202, 2010.

GRASEL, Fábio S. *et al.* Principal component analysis of commercial tannin extracts using digital images on mobile devices. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [S. l.], v. 27, n. 12, p. 2372–2377, 2016.

HELPER, Gilson A. *et al.* PhotoMetrix: An application for univariate calibration and principal components analysis using colorimetry on mobile devices. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [S. l.], v. 28, n. 2, p. 328–335, 2017.

HELPER, Gilson Augusto. **Photometrix**. [s. l.], 2015. Disponível em: <http://www.photometrix.com.br/>. Acesso em: 27 fev. 2020.

HELPER, Gilson Augusto *et al.* A New Tool for Interpretation of Thermal Stability of Raw Milk by Means of the Alizarol Test Using a PLS Model on a Mobile Device. **Food Analytical Methods**, [S. l.], v. 11, n. 7, p. 2022–2028, 2018.

HONG, Jong Il; CHANG, Byoung Yong. Development of the smartphone-based colorimetry for multi-analyte sensing arrays. **Lab on a Chip**, [S. l.], v. 14, n. 10, p. 1725–1732, 2014.

HOSSAIN, Mozammel Md *et al.* **Determination of pH, caffeine and reducing sugar in energy drinks available in Bangladesh** *New York Science Journal*. [S. l.: s. n.]. Disponível em: <http://www.sciencepub.net/newyork>.

IAL, Instituto Adolfo Lutz. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análises de alimentos**. Sao Paulo, SP, Brasil, 2008. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016\\_3\\_19/analisedealimentosial\\_2008.pdf](http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016_3_19/analisedealimentosial_2008.pdf). Acesso em: 1 mar. 2020.

ILASLAN, Kerem; BOYACI, Ismail Hakki; TOPCU, Ali. Rapid analysis of glucose, fructose and sucrose contents of commercial soft drinks using Raman spectroscopy. **Food Control**, [S. l.], v. 48, p. 56–61, 2015.

IM, Seong Hyun *et al.* An animal cell culture monitoring system using a smartphone-mountable paper-based analytical device. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, [S. l.], v. 229, p. 166–173, 2016.

JUNG, Youngkee *et al.* Smartphone-based colorimetric analysis for detection of saliva alcohol concentration. **Applied Optics**, [S. l.], v. 54, n. 31, p. 9183, 2015.

KEHOE, Eric; PENN, R. Lee. Introducing colorimetric analysis with camera phones and digital cameras: An activity for high school or general chemistry. **Journal of Chemical Education**, [S. l.], v. 90, n. 9, p. 1191–1195, 2013.

KILIÇ, Volkan *et al.* Single-Image-Referenced Colorimetric Water Quality Detection Using a Smartphone. **ACS Omega**, [S. l.], v. 3, n. 5, p. 5531–5536, 2018.

KIM, Sung Deuk; KOO, Youngmi; YUN, Yeoheung. A smartphone-based automatic measurement method for colorimetric pH detection using a color adaptation algorithm. **Sensors (Switzerland)**, [S. l.], v. 17, n. 7, 2017.

KIM, Yeon Kye; SAKANO, Yoshiyuki. Analyses of reducing sugars on a thin-layer chromatographic plate with modified somogyi and nelson reagents, and with copper bicinchoninate. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, [S. l.], v. 60, n. 4, p. 594–597, 1996.

KOMES, Draženka *et al.* Application of different methods for carbohydrates determination in raw materials and confectionery products enriched with dietary fibres. **Proceedings of the 11th International Congress on Engineering and Food**, [S. l.], p. 1–6, 2011.

KUMAR, V.; GILL, K. D. To Perform Qualitative Test for Reducing Substances in Urine. *In: Basic Concepts in Clinical Biochemistry: A Practical Guide*,. [S. l.: s. n.]. p. 49–52.

LANE, H.; EYNON, L. Determination of reducing sugar by means of Fehling's solution with methylene blue as internal indicator. **J. Soc. Chem. Ind.**, [S. l.], v. 17, p. 32–37, 1923.

LATIMER JR., George W. **Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL**. 21. ed. Rockville, MD, USA: AOAC International, 2019.

LEVIN, Saurabh *et al.* Monitoring of fluoride in water samples using a smartphone. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 551–552, p. 101–107, 2016.

LI, Jiangbo *et al.* Comparison and Optimization of Models for Determination of Sugar Content in Pear by Portable Vis-NIR Spectroscopy Coupled with Wavelength Selection Algorithm. **Food Analytical Methods**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 12–22, 2019.

LIMA, A. C. S.; AFONSO, J. C. A Química do Refrigerante. **Pesquisa no Ensino de Química**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 6, 2009.

LIMA, Marcelo B. *et al.* A digital image-based micro-flow-batch analyzer. **Microchemical Journal**, [S. l.], v. 106, n. Complete, p. 238–243, 2013.

LIU, Qiang *et al.* Near-Infrared Hyperspectral Imaging Rapidly Detects the Decay of Postharvest Strawberry Based on Water-Soluble Sugar Analysis. **Food Analytical Methods**, [S. l.], 2019.

LOPES, Teresa I. M. S. *et al.* Construction and use of a tubular picrate ion-selective electrode for reducing sugar determination in Port wine by flow-injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, [S. l.], v. 308, n. 1–3, p. 122–128, 1995. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000326709400598G>. Acesso em: 22 fev. 2020.

LOPEZ-RUIZ, Nuria *et al.* Smartphone-based simultaneous pH and nitrite colorimetric determination for paper microfluidic devices. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 86, n. 19, p. 9554–9562, 2014.

LUDWIG, Thomas G.; GOLDBERG, Hyman J. V. The Anthrone Method for the Determination of Carbohydrates in Foods and in Oral Rinsing. **Journal of Dental Research**, [S. l.], v. 35, n. 1, p. 90–94, 1956.

LUO, Ke *et al.* Colorimetric determination of the activity of starch-debranching enzyme via modified tollens' reaction. **Nanomaterials**, [S. l.], v. 9, n. 9, 2019.

MA, Baiquan *et al.* Comparative assessment of sugar and malic acid composition in cultivated and wild apples. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 172, p. 86–91, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814614013995?via%3Dihub>. Acesso em: 26 fev. 2020.

MACHADO, Fabíola Lopes Caetano; CAMPOS, Gisélia; SOUZA, Mariana Temponi Godinho. Comparação entre os métodos de Lane-Eynon e polarimétrico para determinação de amido em farinha de mandioca. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, [S. l.], v. 68, n. 1, p. 155–159, 2009.

MAGWAZA, Lembe Samukelo; OPARA, Umezuruike Linus. Analytical methods for determination of sugars and sweetness of horticultural products-A review. **Scientia Horticulturae**, [S. l.], v. 184, p. 179–192, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423815000114>. Acesso em: 27 fev. 2020.

MARQUES FILHO, Ogê; VIEIRA NETO, Hugo. **Processamento Digital de Imagens**. Rio de Janeiro: Brasport, 1999.

MARQUES, Tadeu Alcides *et al.* Automated sugar analysis. **Food Science and Technology**, [S. l.], v. 36, n. 1, p. 70–75, 2016.

MARRUBINI, Giorgio *et al.* Determination of the Sugar Content in Commercial Plant Milks by Near Infrared Spectroscopy and Luff-Schoorl Total Glucose Titration. **Food Analytical Methods**, [S. l.], v. 10, n. 5, p. 1556–1567, 2017.

MARTINEZ, Andres W. *et al.* Simple telemedicine for developing regions: Camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 80, n. 10, p. 3699–3707, 2008.

MATISSEK, R.; SCHENEPEL, F.M.; STEINER, G. **Análisis de los Alimentos: Fundamentos, métodos, aplicaciones**. Espanha [s. n.].

MCCRACKEN, Katherine E.; YOON, Jeong Yeol. **Recent approaches for optical smartphone sensing in resource-limited settings: A brief review**. [S. l.]: Royal Society of Chemistry, 2016.

MEI, Qingsong *et al.* Smartphone based visual and quantitative assays on upconversional paper sensor. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 75, p. 427–432, 2016.

MICHAEL, Somogyi. Notes on sugar determination. **J. Biol. Chem.**, [S. l.], n. 195, p. 19–23, 1952.

MILLER, Gail Lorenz. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MORGANO, Marcelo A. *et al.* Determinação de açúcar total em café cru por espectroscopia no infravermelho próximo e regressão por mínimos quadrados parciais. **Química Nova**, [S. l.], v. 30, n. 2, p. 346–350, 2007.

NAES, T. *et al.* **A User Friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification**. Chichester, United Kingdom.: NIR Publications, 2002.

NEGRULESCU, Anamaria *et al.* Adapting the reducing sugars method with dinitrosalicylic acid to microtiter plates and microwave heating. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [S. l.], v. 23, n. 12, p. 2176–2182, 2012.

NELSON, David L.; COX, Michael. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. São Paulo, SP, Brasil: Artmed, 2014.

NELSON, Norton. A PHOTOMETRIC ADAPTATION OF THE SOMOGYI METHOD FOR THE DETERMINATION OF GLUCOSE. **The Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 153, n. 2, p. 375–380, 1944. Disponível em: <http://www.jbc.org/>

NIKOLELIS, D. P.; PAPASTATHOPOULOS, D. S.; HADJIIOANNOU, T. P. A simple potentiometric method for the determination of reducing substances in urine with a copper-selective electrode. **Analytica Chimica Acta**, [S. l.], v. 98, p. 227–232, 1978.

OH, Byung Taek *et al.* Probiotic-mediated blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) fruit fermentation to yield functionalized products for augmented antibacterial and antioxidant activity. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [S. l.], v. 124, n. 5, p. 542–550, 2017.

OLIVEIRA, A. J. **Açúcares redutores: princípios da Oxiredutimetria**. São Paulo, SP, Brasil: Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, 2002.

OLIVEIRA, Gabrieli *et al.* Comparison of NIR and MIR spectroscopic methods for determination of individual sugars, organic acids and carotenoids in passion fruit. **Food Research International**, [S. l.], v. 60, p. 154–162, 2014.

OLIVEIRA, Luciana F. *et al.* Use of digital images and principal component analysis for the identification of Cr (VI) levels in soil samples. **Revista Virtual de Química**, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 169–178, 2013.

ONCESCU, Vlad; MANCUSO, Matthew; ERICKSON, David. Cholesterol testing on a smartphone. **Lab on a Chip**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 759–763, 2014.

PAN, Lei-qing *et al.* Determination of sucrose content in sugar beet by portable visible and near-infrared spectroscopy. **Food chemistry**, [S. l.], v. 167C, p. 264–271, 2015.

PARK, Tu San; YOON, Jeong Yeol. Smartphone detection of *Escherichia coli* from field water samples on paper microfluidics. **IEEE Sensors Journal**, [S. l.], v. 15, n. 3, p. 1902–1907, 2015.

PATACA, Luiz C. M. *et al.* Determination of apparent reducing sugars, moisture and acidity in honey by attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectrometry. **Talanta**, [S. l.], v. 71, n. 5, p. 1926–1931, 2007.

PEREIRA, Engil Isadora Pujol *et al.* Otimização e validação de um método enzimático para a determinação de glicose em tubérculos de batata. **Ciência Rural**, [S. l.], v. 38, n. 5, p. 1227–

1232, 2008.

PESSOA, Kenia Dias *et al.* A digital image method of spot tests for determination of copper in sugar cane spirits. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [S. l.], v. 185, p. 310–316, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2017.05.072>

PICO, Joana *et al.* Quantification of sugars in wheat flours with an HPAEC-PAD method. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 173, p. 674–681, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814614016665>. Acesso em: 29 fev. 2020.

PUANGBANLANG, Chanoknan *et al.* A paper-based device for simultaneous determination of antioxidant activity and total phenolic content in food samples. **Talanta**, [S. l.], v. 198, p. 542–549, 2019.

RAMASAMI, Ponnadurai *et al.* Quantification of sugars in soft drinks and fruit juices by density, refractometry, infrared spectroscopy and statistical methods. **South African Journal of Chemistry**, [S. l.], v. 57, p. 24–27, 2004. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/258844657>

RAMBLA, F. J. *et al.* Simple partial least squares-attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectrometric method for the determination of sugars in fruit juices and soft drinks using aqueous standards. **Analyst**, [S. l.], v. 123, n. 2, p. 277–281, 1998.

RECH, André Machado; WEILER, Fábio Henrique; FERRÃO, Marco Flôres. Determination of Total Sugar Content in Soy-Based Drinks Using Infrared Spectroscopy and Chemometrics. **Food Analytical Methods**, [S. l.], v. 11, n. 7, p. 1986–1993, 2018.

RICO-YUSTE, Alberto *et al.* Furfural Determination with Disposable Polymer Films and Smartphone-Based Colorimetry for Beer Freshness Assessment. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 88, n. 7, p. 3959–3966, 2016.

RODA, Aldo *et al.* Smartphone-based biosensors: A critical review and perspectives. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 79, p. 317–325, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993615301060>. Acesso em: 27 fev. 2020.

SANTOS, José Soares Dos; SANTOS, Maria Lúcia Pires Dos; AZEVEDO, Alana Dos Santos. Validação de um método para determinação simultânea de quatro ácidos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência em polpas de frutas congeladas. **Química Nova**, [S. l.], v. 37, n. 3, p. 540–544, 2014.

SANTOS NETO, Joao H. *et al.* Speciation analysis based on digital image colorimetry: Iron (II/III) in white wine. **Talanta**, [S. l.], v. 194, 2019.

SARTINI, Raquel P. *et al.* Determination of reducing sugars by flow injection gravimetry. **Analytica Chimica Acta**, [S. l.], v. 366, n. 1–3, p. 119–125, 1998.

SHACHMAN, Maurice. **The Soft Drinks Companion A Technical Handbook for the Beverage Industry**. 1st Editio ed. Boca Raton - FL: CRC Press, 2004.

SHAO, Yijing; LIN, Amy Hui Mei. Improvement in the quantification of reducing sugars by miniaturizing the Somogyi-Nelson assay using a microtiter plate. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 240, p. 898–903, 2018.

SHETTY, Nisha *et al.* Development of NIR calibration models to assess year-to-year variation in total non-structural carbohydrates in grasses using PLSR. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, [S. l.], v. 111, p. 34–38, 2012.

SILVA NETO, Gerson F.; FONSECA, Alexandre; BRAGA, Jez W. B. Classificação de águas minerais baseada em imagens digitais obtidas por smartphones. **Química Nova**, [S. l.], v. 39, n. 7, p. 876–881, 2016.

SILVA, Roberto do Nascimento *et al.* Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [S. l.], v. 23, n. 3, p. 337–341, 2003.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Principles of Instrumental Analysis**. 6. ed. USA: Cengage Learning, 2006.

SOARES, Samara; LIMA, Manoel J. A.; ROCHA, Fábio R. P. A spot test for iodine value determination in biodiesel based on digital images exploiting a smartphone. **Microchemical Journal**, [S. l.], v. 133, p. 195–199, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X16306051?via%3Dihub>. Acesso em: 26 fev. 2020.

SOLMAZ, Mehmet E. *et al.* Quantifying colorimetric tests using a smartphone app based on machine learning classifiers. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, [S. l.], v. 255, p. 1967–1973, 2018.

SOLOMON, Chris; BRECKON, Toby. **Fundamentals of Digital Image Processing: A Practical Approach with Examples in Matlab**. 1 st ed. USA: John Wiley & Sons Ltda, 2011.

SOROL, Natalia *et al.* Visible/near infrared-partial least-squares analysis of Brix in sugar cane juice. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, [S. l.], v. 102, p. 100–109, 2010.

SOUZA, Darliana Mello *et al.* Uso do Photometrix para determinação de fosfato em fertilizantes: um recurso didático para ensino de química analítica. **Seminário Internacional de Educação, tecnologia e Sociedade: Ensino Híbrido.**, [s. l.], 2019

SPENCER, G. L.; MEADE, G. P. **Special Reagentes. Cane Sugar Handbook**. New York, Wiley: Wiley, 1945.

SYLVIE, Bureau *et al.* Application of ATR-FTIR for a rapid and simultaneous determination of sugars and organic acids in apricot fruit. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 115, p. 1133–1140, 2009.

TAVARES, José Torquato de Queiroz *et al.* Interferência do ácido ascórbico na determinação de açúcares redutores pelo método de Lane e Eynon. **Química Nova**, [S. l.], v. 33, n. 4, p. 805–809, 2010.

TÔRRES, Adamastor Rodrigues *et al.* A digital image-based method for determining of total acidity in red wines using acid-base titration without indicator. **Talanta**, [S. l.], v. 84, n. 3, p.

601–606, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914011001330>. Acesso em: 27 fev. 2020.

TREVELYAN, W. E.; HARRISON, T. S. Dosagem de glicídeos totais pelo método de antrona. **J. Biol. Chem.**, [S. l.], v. 50, p. 292, 1952.

VALENTE, Ana *et al.* Development of an orange juice in-house reference material and its application to guarantee the quality of vitamin C determination in fruits, juices and fruit pulps. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 154, p. 71–77, 2014.

VENTE, Johan A. *et al.* Comparison of sorption isotherms of mono- and disaccharides relevant to oligosaccharide separations for Na, K, and Ca loaded cation exchange resins. **Chemical Engineering Communications**, [S. l.], v. 192, n. 1–3, p. 23–33, 2005.

VIANA, Fernando Luiz E. INDÚSTRIA DE BEBIDAS NÃO ALCOÓLICAS. **Caderno setorial ETENE**, [S. l.], v. Ano 3, n. 36, p. 1–14, 2018.

WOOD, Ian P. *et al.* Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: Improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay. **Biomass and Bioenergy**, [S. l.], v. 44, p. 117–121, 2012.

XIA, Meng Lei *et al.* A novel digital color analysis method for rapid glucose detection. **Analytical Methods**, [S. l.], v. 7, n. 16, p. 6654–6663, 2015.

ZAGATTO, Elias Ayres Guidetti; *et al.* Determinação de Açúcares redutores totais , empregando sistemas de análises por injeção em fluxo: Aplicação a amostras de relevância sucro-alcooleira. **Revista Analytica**, [S. l.], v. 19, 2005.

ZHU, Zuoyi *et al.* Characterization of sugar composition in Chinese royal jelly by ion chromatography with pulsed amperometric detection. **Journal of Food Composition and Analysis**, [S. l.], v. 78, p. 101–107, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157518304095>. Acesso em: 26 fev. 2020.

ZIELINSKI, Acácio Antonio Ferreira *et al.* Development and optimization of a HPLC-RI method for the determination of major sugars in apple juice and evaluation of the effect of the ripening stage. **Food Science and Technology**, [S. l.], v. 34, n. 1, p. 38–43, 2014. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612014000100005&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612014000100005&lng=en&tlng=en). Acesso em: 27 fev. 2020.